

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**MOWAT WILSON SENDROMLU HASTALARDA
KLİNİK DEĞERLENDİRME VE ZEB2 GEN
MUTASYON/DELESYON ANALİZİ**

Dr. Esra KILIÇ

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Koray BODUROĞLU**

**ANKARA
2013**

TEŞEKKÜR

Bana, her zaman destek olan aileme, Őimdiye kadar eğitimime katkıda bulunan tım hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Dr. Esra KILIÇ

ÖZET

Esra Kılıç, Mowat Wilson Sendromlu Hastalarda Klinik Değerlendirme ve ZEB2 Gen Mutasyon/Delesyon analizi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı Çocuk Genetik Hastalıkları Yan Dal Uzmanlık Tezi, Ankara 2013.

Mowat-Wilson sendromu, tipik yüz görünümü, mikrosefali, epilepsi, Hirschsprung hastalığı, korpus kallozum agenezisi, genitoüriner anomaliler ve doğumsal kalp hastalığı gibi değişik spektrumda doğumsal anomalilerin görülebildiği bir sendromdur. Sıklığı tam olarak bilinmemektedir fakat çoğu hastanın tanı alamadığı tahmin edilmektedir. Mowat-Wilson sendromu, 2q22 de lokalize ZEB2 geninin *de novo* dominant mutasyon veya delesyonları sonucu oluşur. Bugüne kadar tipik fenotipi olan hastalarda 110'dan fazla mutasyon, delesyon tanımlanmıştır. Fakat Türk hastalarda yapılan bir çalışma yoktur. Bu çalışmada kliniğimizde Mowat-Wilson sendromu tanısıyla izlenen hastaların detaylı klinik bulguları incelenerek moleküler DNA analizleri yapılmıştır. Mowat-Wilson sendromu tanısı alan 10 hastanın klinik bulguları ve dizi analizi sonuçları tariflenmiştir. On hastanın 5' inde ZEB2 gen mutasyonu tespit edilmiştir. Bunlardan 3'ü *nonsense* 2'si *frameshift* mutasyondur. Üç mutasyon ekzon 8 de lokalizedir, ve 2 mutasyon literatürde daha önce tanımlanmamış yeni mutasyonlardı.

Anahtar kelimeler: ZEB2 geni, DNA dizi analizi, zihinsel yetersizlik

ABSTRACT

Kılıç E., Clinical Evaluation and *ZEB2* Gene Mutation/Deletion Analysis in Mowat Wilson Syndrome Patients. Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Pediatric Genetic. Ankara 2008.

Mowat-Wilson syndrome is an intellectual disability syndrome associated with distinctive facial features, microcephaly, epilepsy, variable spectrum of congenital anomalies, including Hirschsprung disease, agenesis of the corpus callosum, genitourinary abnormalities, and congenital heart disease. The prevalence of Mowat-Wilson syndrome is currently unknown but it seems probably underdiagnosed. Mowat-Wilson syndrome is caused by *de novo* dominant mutations or deletions in *ZEB2* gene which localised at 2q22. To date, more than 110 mutations/deletions have been reported in patients with a typical phenotype, but there is no study in Turkish patients. We evaluated the detailed clinical features of Mowat-Wilson syndrome patients whom where diagnosed in our clinic and for whom molecular DNA analyses were performed. In this work we describe clinical findings and sequencing analysis results of 10 Mowat-Wilson syndrome patients. *ZEB2* gene mutations were found in 5 patients. Three of them were *nonsense* and 2 of them were *frameshift* mutations. Three mutations were localized in exon 8, and 2 mutations were novel mutations which were not described before.

Key words: *ZEB2* gene, DNA sequence analysis, intellectual disability

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.EPİDEMİYOLOJİK VERİLER	3
2.2.KLİNİK BULGULAR	3
2.2.1. Yüzdeki Dismorfik Bulgular	4
2.2.2. Büyüme ve beslenme	8
2.2.3. Gelişim ve davranış özellikleri ve nörolojik bulgular	9
2.2.4. Hirschsprung hastalığı ve diğer gastrointestinal bulgular	10
2.2.5. Kardiyovasküler bulgular	11
2.2.6. Genitoüriner- renal bulgular	12
2.2.7. Kas iskelet sistemini ilgilendiren bulgular	12
2.2.8. Göz bulguları	13
2.2.9. İşitme ile ilgili bulgular	13
2.2.10. Cilt bulguları	14
2.2.11. Diş anomalileri	14
2.2.12. Diğer klinik bulgular	14
2.3.ETYOLOJİ, PATOGENEZ VE GENETİK	16
2.4.TANISAL METODLAR.....	21
2.5.GENETİK DANIŞMA VE PRENATAL TANI	23
2.6.AYIRICI TANI	24
2.7.YAKLAŞIM, TEDAVİ VE PROGNOZ	27

3.	HASTALAR VE YÖNTEM.....	31
3.1.	HASTALAR.....	31
3.2.	YÖNTEM.....	32
3.2.1.	Kan örneklemesi.....	33
3.2.2.	Kromozom analizi.....	33
3.2.3.	DNA izolasyonu.....	35
3.2.4.	DNA Dizi analizi.....	36
3.2.4.1.	DNA Dizi analizi primerlerinin tasarlanması.....	36
3.2.4.2.	Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	38
3.2.4.3.	PCR ürününü saflaştırma.....	39
3.2.4.4.	Dizi reaksiyonu.....	40
3.2.4.5.	Dizi pürifikasyonu.....	40
3.2.4.6.	Analiz.....	41
3.2.4.7.	Verilerin değerlendirilmesi.....	41
4.	BULGULAR.....	42
4.1.	KLİNİK, SİTOGENETİK VE MOLEKÜLER BULGULARI İLE HASTALAR.....	42
4.2.	KLİNİK VE MOLEKÜLER BULGULARIN GENEL DEĞERLENDİRMESİ.....	57
5.	TARTIŞMA.....	70
6.	SONUÇLAR.....	778
7.	KAYNAKLAR.....	80
8.	EKLER.....	879
	EK-1. Klinik değerlendirme formu.....	879

SİMGELER VE KISALTMALAR

AK	:	Aort koarktasyonu
ASD	:	Atriyal septal defekt
CGH	:	<i>Comperative Genomic Hybridization</i> (Karşılaştırmalı Genom Hibridizasyonu)
CtBP	:	C- terminal bağlayıcı protein
C-ZF	:	C- terminal kısım
DMSO	:	Dimetil sülfo oksit
EEG	:	Elektroensefalografi
HCSP	:	Hirschsprung hastalığı
HD	:	Homeodomain benzeri yapı
IQ	:	<i>intelligence quotient</i>
MLPA	:	<i>Multiplex ligation dependent probe amplification</i>
MRG	:	Manyetik rezonans görüntüleme
MWS	:	Mowat Wilson sendromu
N-ZF	:	N-terminal kısım
PCR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDA	:	Patent duktus arteriyozus
PFO	:	Patent foramen ovale
PS	:	Pulmoner stenoz
PY	:	Pulmoner yetmezlik
SIB 1	:	<i>Smad interakting protein 1</i>
SBD	:	Smad bağlayıcı protein
SNP	:	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SSS	:	Santral Sinir Sistemi
TY	:	Triküspit yetmezlik
TGF-β	:	<i>Transforming growth faktör-β</i>
UCSC	:	<i>University of California at Santa Cruz Genome Browser</i>
VSD	:	Ventriküler septal defekt
ZEB 2	:	<i>Zinc Finger E-box binding homeobox 2 geni</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

- Şekil 2.1.** MWS, artmış ense kalınlığı, ince seyrek saçlar, yüksek alınla beraber kare yüz şeklinde, infantil dönem fasiyal dismorfik bulguları..... 5
- Şekil 2.2.** MWS, derin yerleşimli iri gözler, geniş burun kökü, kemerli burun, belirgin yuvarlak burun ucu, belirgin kolumella, M-şeklinde üst dudak ile beraber açık ağız, sık gülümseyen mutlu yüz ifadesi şeklinde, çocukluk dönemi fasiyal dismorfik bulguları 5
- Şekil 2.3.** MWS'de eritrosit korpüskülü veya *orechiette pasta* görünümünde tipik yukarı dönük kulak memesi ve medialde açılanma ve seyrelme gösteren kalın kaşlar..... 6
- Şekil 2.4.** MWS adölesan dönem fasiyal dismorfik bulguları. 6
- Şekil 2.5.** *ZEB2* geni, genomik organizasyonu, kodlanan ekzonlar (ekzon 2-10) ve fonksiyonel domainler..... 16
- Şekil 2.6.** Goldberg- Shprintzen megakolon sendromunda dismorfik bulgular. 25
- Şekil 2.7.** Angelman sendromu fasiyal dismorfik bulguları 26
- Şekil 2.8.** Farklı dismorfik - klinik bulguları ile MWS ayırıcı tanısında yer alan diğer dismorfik sendromlar; **a.** Rett sendromu, **b.** Rubinstein Taybi sendromu, **c.** Smith-Lemli-Opitz sendromu, **d.** Pitt-Hopkins sendromu, **e.** Opitz G sendromu, **f.** X'e bağlı α talasemi-zihinsel yetersizlik sendromu 27
- Şekil 4.1.** **a.** Hasta 1, 4 yaş fasiyal dismorfik bulguları, **b.** Kraniyal MRG'de korpus kallozum hipogenezisi. 42

Şekil 4.1.	c. Hasta 1, <i>ZEB2</i> gen dizi analizi sonucu elde edilen elektroferogramda ekzon 7’de iki nükleotidlik ardışık 2 kez tekrar edilen bir dizinin tek kopyasının silindiği ok işareti ile gösteriliyor.	43
Şekil 4.2.	a. Hasta 2, 7 yaş fasiyal dismorfik bulguları.....	44
Şekil 4.2.	b. Hasta 2, <i>ZEB2</i> gen dizi analizi sonucu elde edilen elektroferogramda ekzon 3’de beş nükleotidlik ardışık 2 kez tekrar edilen bir dizinin tek kopyasının silindiği ok işareti ile gösteriliyor.	45
Şekil 4.3.	a. Hasta 3, 4 yaş fasiyal dismorfik bulguları.....	46
Şekil 4.3.	b. Hasta 3, <i>ZEB2</i> gen dizi analizi sonucu elde edilen elektroferogramda ekzon 8’de saptanan heterozigot <i>nonsense</i> c.1467T>A mutasyonu ok işareti ile gösteriliyor.....	47
Şekil 4.4.	a. Hasta 4, 9 yaş fasiyal dismorfik bulguları.....	48
Şekil 4.4.	b. Hasta 4, <i>ZEB2</i> gen dizi analizi sonucu elde edilen elektroferogramda ekzon 8-5’ de saptanan heterozigot <i>nonsense</i> c.2761C>T mutasyon ok işareti ile gösteriliyor.....	49
Şekil 4.5.	a. Hasta 5, 4 yaş fasiyal dismorfik bulguları.....	50
Şekil 4.5.	b. Hasta 5, <i>ZEB2</i> gen dizi analizi sonucu elde edilen elektroferogramda ekzon 8 de saptanan heterozigot <i>nonsense</i> c.2083C>T mutasyonu ok işareti ile gösteriliyor.....	51
Şekil 4.6.	Hasta 6, 6 yaş fasiyal dismorfik bulguları.	52
Şekil 4.7.	Hasta 7, 8 yaş fasiyal dismorfik bulguları.	53
Şekil 4.8.	Hasta 8, 2,5 yaş fasiyal dismorfik bulguları.	54
Şekil 4.9.	a. Hasta 9, 7 yaş fasiyal dismorfik bulguları, b. Kraniyal MRG’de korpus kallozum agenezisi ve ventriküllerde kolposefali genişleme.....	55
Şekil 4.10.	Hasta 10, 18 yaş fasiyal dismorfik bulguları.....	56

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 2.1.	MWS'de farklı yaşlarda fasiyal dismorfik bulguların dağılımı	7
Tablo 2.2.	MWS'de literatürde bildirilmiş klinik bulgular ve sıklık oranları.	15
Tablo 2.3.	MWS tanısında kullanılabilen genetik testlerin özeti.	23
Tablo 3.1.	<i>ZEB2</i> dizileme analizi için kullanılan primerlerin dizileri, PCR ürünlerinin uzunluğu ve erime sıcaklıkları.	37
Tablo 4.1.	Hastaların başvuru, tanı ve son kontrol yaşları.	57
Tablo 4.2.	Hastaların zeka-gelişim düzeyi.	58
Tablo 4.3.	Hastaların fasiyal dismorfik bulgularının genel değerlendirmesi.	59
Tablo 4.4.	Nöbet geçiren hastaların tedavi özellikleri.	60
Tablo 4.5.	Hastaların ağırlık ve boy persentil değerlerinin dağılımı.	61
Tablo 4.6.	Saptanan kardiyak anomali ve tedavi-izlem şekli.	61
Tablo 4.7.	İntestinal bulgular.	62
Tablo 4.8.	Göz bulguları.	62
Tablo 4.9.	Hastaların moleküler ve sitogenetik bulguları.	65
Tablo 4.10.	Bulguların görülme sıklığına göre mutasyon saptanan (+) ve saptanmayan (-) hastaların karşılaştırılması.	66
Tablo 4. 11.	Mutasyon saptanan hastaların klinik bulgularının literatürle karşılaştırılması.	67
Tablo 4.12.	Hastaların klinik özellik ve bulguları.	68

1. GİRİŞ

Mowat Wilson sendromu (MWS) göreceli olarak yeni tanımlanmış çoklu doğumsal anomali ile giden zihinsel yetersizlik sendromlarından biridir. Zihinsel yetersizlik ile beraber mikrosefali, tipik dismorfik yüz bulguları ve Hirschsprung hastalığı (HCSP) birlikteliği ile karakterizedir. Prevalansı kesin olarak bilinmemektedir, bugüne kadar literatürde 200'den fazla vaka bildirilmiştir, ancak özellikle HCSP ile birlikte olmayan vakaların yeterince tanı alamadığı düşünülmektedir.

Hastaların yüz bulguları (medialde açılma gösteren geniş kaşlar, hipertelorizm, derin yerleşimli iri gözler, kemerli burun, belirgin kolumella, yukarı dönük kulak memesi, belirgin gamzeli çene) oldukça karakteristiktir. Ayrıca, büyüme ve gelişme geriliği, orta-ağır derece zeka geriliği, nöbet, santral sinir sistemi (SSS) gelişim anomalileri; gastrointestinal, orofaringeal bulgular, yapısal doğumsal kalp hastalıkları, ürogenital-renal anomaliler, kas-iskelet sistemi bulguları, mikroftalmi ve strabismus gibi göz anomalileri, tekrarlayan orta kulak iltihabına bağlı iletim tipi işitme kaybı, dişlerde malpozisyon ve otonomik disregülasyon gibi diğer klinik bulgular görülebilir.

MWS, 2q21-q23 lokusuna lokalize *Zinc Finger E-box binding homeobox 2 (ZFHX1B, SIB1, ZEB2)* geninin heterozigot delesyonu veya mutasyonu sonucu oluşur. Bugüne kadar *ZEB2* geninde 110'dan fazla değişiklik bu sendromla ilişkilendirilmiştir. Bugüne kadar tanımlanmış bir genotip fenotip ilişkisi yoktur. Klinik olarak MWS'den şüphelenilen hastalarda *ZEB2* geninin protein kodlayan bölgelerinin tamamı sekanslanarak, hastalığa sebep olan mutasyonların %80'i gösterilebilir.

MWS'nin ayırıcı tanısında Shprintzen-Goldberg sendromu, Angelman sendromu, Smith-Lemli-Opitz sendromu, Rubinstein Taybi sendromu ve

Hirschsprung hastalığının diğerk sendromik olan ve sendromik olmayan formları yer alır. MWS'nin karakteristik yüz görünümü Hirschsprung hastalığı olmasa bile *ZEB2* mutasyon analizi istenmesi için yeterlidir. Hastaların çoğu etiyojiden *de novo* mutasyonların sorumlu tutulduğu sporadik vakalar şeklindedir. Ancak düşük de olsa olası germ hücre mozaizmi veya dengeli familial translokasyon vakalarında tekrarlama riski mevcuttur. Eğer özgün ailesel mutasyon bilinmiyorsa, prenatal tanı açısından korpus kallozum agenezisi ve mikrosefali dışında takip edilebilecek bir morfolojik bulgu yoktur.

Bu çalışmada, bölümümüzde MWS ile uyumlu bulguları olan hastaların klinik değerlendirmesi ve moleküler genetik analizleri yapılarak hastaların tanısının kesinleştirilmesi, tanısal değeri yüksek klinik bulguların belirlenmesi ve böylece ileride başvuracak hastaların daha az tetkikle daha hızlı tanı almasının sağlanması amaçlanmıştır. Ayrıca, hastalıktan sorumlu olabilecek olası yeni genlerin araştırılması için aday hastaları belirlemek ve elde edilen bilgiler ışığında hastalar ve aileleri için iyi bir izlem, tedavi, rehabilitasyon, genetik danışma ve prenatal tanı imkanını sunmak da hedefler arasındadır.

2. GENEL BİLGİLER

Mowat-Wilson sendromu (MWS; OMIM 235730), 1998'de Mowat ve arkadaşları tarafından zihinsel yetersizlik, mikrosefali, karakteristik yüz görünümü ve Hirschsprung hastalığı gibi bulguları olan birbirinden bağımsız altı hastada tanımlanan yeni bir çoklu doğumsal anomali sendromudur (1). Diğer klinik bulgular arasında; orta-ağır zeka geriliği, epilepsi, genitoüriner anomaliler, doğumsal kalp hastalığı, korpus kollozum agenezisi ve göz anomalileri yer alır. Hastalıktan sorumlu olması olası genetik değişiklik 1998'de yine Mowat ve ark. tarafından 2q21-q23 lokusuna lokalize edilmiş, 2001 yılında da birbirinden bağımsız iki grup tarafından *ZEB2* genindeki mutasyon veya delesyonların MWS'den sorumlu olduğu gösterilmiştir (1,2).

2.1. EPİDEMİYOLOJİK VERİLER

Kesin olarak bilinmemekle birlikte MWS hastalığının prevalansı, 1/50000-1/70000 olarak tahmin edilmektedir (3). Literatürde 200'den fazla vaka tanımlanmıştır, ancak özellikle Hirschsprung hastalığı ile birlikte olmayan vakaların yeterince tanı alamadığı düşünülmektedir. Bugüne kadar hastalıkla ilgili Kuzey Avrupa, Avustralya, İtalya ve Amerika'dan *ZEB2* genini etkileyen 110'dan fazla mutasyon, delesyon ve sitogenetik bozukluk tarif edilmiştir (4,5). MWS benzer klinik-dismorfik özellikler ile tüm etnik gruplarda görülür. İlk yayınlarda erkek hastaların göreceli olarak daha fazla sayıda olduğu (erkek/kız: 1,42/1) bildirilmiş olmakla beraber, daha yeni çalışmalar hastalığın her iki cinsi eşit olarak etkilediğini göstermektedir (4,6,7).

2.2. KLİNİK BULGULAR

MWS'nin genel kabul görmüş tanısal kriterleri mevcut olmamakla beraber, tanı alan tüm hastalarda ağır zihinsel yetersizlik ve tipik yüz bulguları mevcuttur. Hastaların çoğunda mikrosefali ve epilepsi vardır.

Herhangi birisi zorunlu olmamakla beraber; HCSP, hipospadias, konjenital kalp hastalığı, korpus kallozum agenezisi gibi konjenital anomalilerden en az biri bulunur (3). Yakın tarihli çalışmalarda klinisyenlerin MWS tipik yüz bulgularına aşına olup hastalığı tanıma oranı arttıkça klinik serilerde HCSP'den yola çıkarak tanı alan hasta oranı azalmaktadır (4,8).

2.2.1. Yüzdeki Dismorfik Bulgular

Yaşla birlikte değişim gösteren tipik dismorfik yüz bulguları özellikle ağır zihinsel yetersizlik ile birlikte görüldüğünde MWS tanısı akla gelmelidir.

Dismorfik yüz bulguları bebeklik döneminde, artmış ense kalınlığı, ince seyrek saçlar, yüksek alınla beraber kare şeklinde yüz (Şekil 2.1); erken çocukluk döneminde, frontal belirginleşme, hipertelorizm, strabismus, epikantus, derin yerleşimli iri gözler, geniş burun kökü, kemerli burun, belirgin yuvarlak burun ucu, belirgin kolumella, M-şeklinde üst dudak ile beraber açık ağız, sık gülümseyen mutlu yüz ifadesi (Şekil 2.2), belirgin ancak dar- üçgen şekilli- gamzeli çene, arkaya dönük kulaklar, telekantus, eversiyon gösteren alt dudak, yüz ve çenenin yukarı doğru dönük duruşu olarak sayılabilir. Özellikle geniş, medial açılanma ve seyreklik gösteren kalın kaşlar ve santral depresyon gösteren, eritrosit korpüskülü veya "orechiette pasta" benzetmesiyle de anılan yukarı dönük kulak memesi, farkedilmesi daha kolay olan tipik bulgulardır (Şekil 2.3).

İlerleyen yaşla beraber kaşlar kalınlaşıp yere paralel hale gelir, kolumellanın belirginleşmesi filtrumun daha kısa görülmesine sebep olur, nazal profil konveksleşir, yüz uzar ve çene belirgin hale gelir. Adölesan dönemde, burun ucu filtruma doğru uzar, prognatizm ile beraber uzun yüz belirginleşir (Şekil 2.4). Yukarı dönük kulak memesi yaşla değişmeyen tipik bir bulgudur ve iyi bir tanısal ipucudur, ancak yaşla kulak memesindeki santral depresyon azalır. Yaşa göre değişen fasiyal dismorfik bulgular Tablo 2.1'de sunulmuştur.



Şekil 2.1. MWS, artmış ense kalınlığı, ince seyrek saçlar, yüksek alınla beraber kare yüz şeklinde, bebeklik dönemi fasiyal dismorfik bulguları (Fotoğraf kaynağı-HÜTF Çocuk Genetik bölümü arşivi).



Şekil 2.2. MWS, derin yerleşimli iri gözler, geniş burun kökü, kemerli burun, belirgin yuvarlak burun ucu, belirgin kolumella, M-şeklinde üst dudak ile beraber açık ağız, sık gülümseyen mutlu yüz ifadesi şeklinde, çocukluk dönemi fasiyal dismorfik bulguları (Fotoğraf kaynağı-HÜTF Çocuk Genetik bölümü arşivi).



Şekil 2.3. MWS'de eritrosit korpüskülü veya *orechiette pasta* görünümünde tipik yukarı dönük kulak memesi ve medialde açılanma ve seyrelme gösteren kalın kaşlar (4) (Fotoğraflar için resmi izin alınmıştır).



Şekil 2.4. MWS adölesan dönem fasiyal dismorfik bulguları (4) (Fotoğraflar için resmi izin alınmıştır).

Tablo 2.1. MWS'de farklı yaşlarda fasiyal dismorfik bulguların dağılımı (3,9).

Bebeklik dönemi
Seyrek saçlar
Kare şeklinde yüz
Düz kaşlar
Derin yerleşimli iri gözler
Hafif hipertelorizm veya telekantus
Yuvarlak belirgin burun ucu
Belirgin kolumella
Eversiyon gösteren alt dudak
Santral depresyon gösteren yukarı dönük kulak memesi
Artmış ense kalınlığı
Çocukluk dönemi
Sık gülümseme ve açık ağız ifadesi
Kolumella daha uzar
Nazal profil konveksleşir
Üst dudak vermilyonu laterale doğru inceler
Adölesan-Erişkin dönem
Yüz uzar
Medial açılanma gösteren kaşlar kalınlaşıp, horizontalleşir
Kolumella aşağı doğru iyice uzar
Kulak memesi yukarı dönüktür ancak santral depresyon azalmıştır
Heterokromi ile beraber sıklıkla mavi gözler
Erken yaşlanma görüntüsü

2.2.2. Büyüme ve beslenme

Doğumda hastaların vücut ağırlığı, boy, baş çevresi gibi büyüme parametreleri normaldir. Ortalama doğum ağırlığı 3370 gr (25-50 persentil), doğum boyu 50,9 cm (50-75 persentil), baş çevresi 33cm (3-10 persentil) olarak bildirilmiştir (10).

Mikrosefali genellikle ilk yılın sonunda gelişir ancak doğumda da mevcut olabilir. Sabit bir bulgu olmamakla beraber, mikrosefali %80 vakada mevcut olan ve sık görülen bir bulgudur (9,11).

HCSP veya yenidoğan cerrahi komplikasyonları söz konusu değilse bebeklik döneminde oral beslenme genellikle normaldir, nazogastrik beslenme ihtiyacı olan vaka sayısı çok azdır. Hastalar besinleri çiğneme işlemini düzgün tamamlayamadığından püre şeklinde yumuşak gıdalara ihtiyaç duyabilirler, etraftaki objeleri ağızlarına sokmaları sıkça öğürme ve kusma sebebi olabilir. Pek çok aile, aşırı salya akmasının önüne geçememekten şikayetçidir. Hastaların çoğu ince yapılıdır, %50 hastada boy kısalığı bildirilmiştir (9). Büyüme geriliğinin sebebi tam olarak bilinmemektedir. MWS hastaları ile ilgili bildirilmiş bir büyüme hormonu çalışması bulunmamaktadır. Korpus kallozum agenezisi, submukozal yarık damak gibi orta hat anomalileri hastalığın bilinen bulguları olmakla birlikte, hipofiz bezini ilgilendiren bir yapısal anomali rapor edilmemiştir (3).

Normal veya erken puberte bildirilen vakalar olmakla beraber, pubertal gelişimle ilgili bir çalışma literatürde mevcut değildir (3).

MWS hastaları için hazırlanmış özel büyüme eğrileri bulunmamaktadır, bu sebeple hastalar standart büyüme eğrileri ile izlenir.

2.2.3. Gelişim ve davranış özellikleri ve nörolojik bulgular

MWS hastalarının tamamında orta-ağır zeka geriliği mevcuttur. Gülümseme ve göz teması gibi erken gelişimsel basamaklar normaldir. Ancak hayatın ilk yılında % 93 vakada hipotoni bildirilmiştir. Hipotoni, motor basamaklarda gecikmeye sebep olur, hastalar ortalama 20 ayda desteksiz oturur, 51 ayda (23-84 ay) yürür (4). Bazı hastalarda görülebilen geniş tabanlı ataksik yürüyüş Angelman sendromu ile karışır. Hastaların çoğu desteksiz veya az yardımla yürüyebilir. İnce motor beceriler de geri kalmıştır, 20 yaşında bir hastanın yardımsız su içebildiği ancak kendi başına giyinip soyunamadığı bildirilmiştir (12).

Hastaların çoğu mutlu bir duygulanım ve uyumlu sosyal davranış özellikleri gösterirler. Sürekli ışık açma-kapama gibi tekrarlayıcı stereotipik hareketler, cisimleri ağızına götürme-kemirme gibi oral davranışlar ve ağırlı uyarana beklenenden az tepki verme MWS'de görülebilen davranış değişiklikleridir. Uzun süreli uyanık kalma veya sabah çok erken saatlerde uyanma gibi uyku bozuklukları sıkça görülebilir. MWS hastalarının üçte birinde klinik olarak belirgin duygulanım problemi ve davranış sorunu tespit edilmiştir (7).

MWS hastalarında konuşma yeteneği 5-6 yaşlarında başlayan birkaç kelime ile sınırlıdır. Çoğu hasta konuşamaz, çok az bir kısmı sadece 100-200 kelimelik bir konuşma becerisine sahiptir. Reseptif dil, ekspresif dilden daha az etkilenmiştir. Hastaların gelişim basamakları yönünden yakın izlenmesi, özel eğitim ve konuşma terapisi imkanlarından yararlanması faydalı olabilir. Hastalar vücut hareketleri ve el işaretleri ile isteklerini anlatmaya meyillidirler (11-13).

Postnatal mikrosefali MWS hastalarının %80'inde, korpus kallozum agenezisi %46'sında bildirilmiştir (9). Korpus kallozum agenezisinin bulunup bulunmaması hastalık prognozunu değiştirmez, ancak varlığı iyi bir tanısal ipucudur. Daha az sıklıkla bildirilen diğer yapısal santral sinir sistemi anomalileri; kortikal atrofi, ventrikülomegali, serebellar hipoplazi, hipokampal

disorganizasyon, frontotemporal hipoplazi, temporal displazi, pakigiri, yama tarzında periventriküler sinyal artışı ve beyaz cevherde incelme olarak sayılabilir (3,4). Yayınlanmış tüm vakaların kraniyal görüntülemesi bulunmadığı için bu sayılanlardan daha çok ve çeşitli santral sinir sistemi malformasyonlarının olabileceği tahmin edilmektedir. *ZEB2* genini ilgilendiren daha büyük delesyonlarla, daha belirgin yapısal SSS malformasyonları görülür, ancak büyük delesyonlara özel bir anomali tipi mevcut değildir (14,15).

Nöbet, MWS hastalarında %74 sıklıkla görülebilen bir nörolojik bulgudur (3,4,9) . Nöbetler genellikle 14,5 ay (1-108) civarında başlar ancak neonatal, erken bebeklik, geç çocukluk veya adölesan döneminde de başlayabilir (16). İlk nöbetler ateş ile aktive olmuş fokal nöbetler şeklindedir (16). MWS hastalığına özel bir nöbet tipi mevcut değildir; jeneralize, fokal, grand mal, absans veya miyoklonik nöbetler görülebilir. Diğer taraftan fokal ve absans nöbetlerin daha sık görüldüğünü belirten yeni yayınlar mevcuttur (16). Elektroensefalografide yaygın düzensiz, uyku ile aktive olan, frontal bölgede aktif, nadiren asimetrik diken dalgalar çoğu hastada görülür (16). Çocukluk döneminde genellikle tedaviye dirençli olan nöbetler, adölesan ve erken erişkin dönemde daha kolay kontrol altına alınır (11).

Üriner retansiyon, bradikardi, hipoventilasyon gibi otonomik disregülasyon bulguları sık bildirilmemekle beraber MWS'de görülebilen diğer nörolojik bulgulardır (3) .

2.2.4. Hirschsprung hastalığı ve diğer gastrointestinal bulgular

Hirschsprung hastalığı (HCSP), MWS hastalarında %56-60 oranında bildirilmiştir (9,17). MWS'de görülen HCSP genellikle kısa segment tutar ve neonatal dönemde semptomatik olmayabilir (3). HCSP tanısını erişkin dönemde alan vakalar dahi mevcuttur (18). MWS hastalarından HCSP tanısı almayan vakaların da %26'sı kronik sebebi açıklanamayan kabızlıktan

şikayetçidir (8,12,19). HCSP bulunan MWS hastalarından, *ZEB2* genini ilgilendiren delesyonları olan hastaların, gende mutasyonu olanlara göre daha uzun aganglionik segmentleri olduğu bildirilmiştir (14). HCSP'nin şiddeti, genetik değişikliğin şiddetinin yanı sıra epigenetik faktörlere de bağlıdır. HCSP'nin zihinsel yetersizlik ve diğer dismorfik bulgularla birlikteliği MWS tanısı için uyarıcıdır, bu sebeple HCSP varlığı MWS hastalarının daha kolay tanı almasını sağlar. Bir başka deyişle HCSP bulunmayan vakaların tanı alması daha fazla klinik deneyim gerektirir. Dirençli kabızlığı olan vakalarda, HCSP tanısı rektal biyopside aganglionik segmentin gösterilmesi ile konulur, tedavisi cerrahidir. Biyopsi negatif vakalarda fonksiyonel dismotiliteyi açığa çıkarmak için baryumlu grafi faydalı olabilir.

Pilor stenozu, MWS hastalarının %5'inde görülebilen bir diğer anomalidir (4,9,13). Pilor stenozu hayatın ilk haftalarında şiddetli kusmalar ile seyreder ve pilorik ultrasonografi ile hastalar çoğunlukla tanı alır. Yarık damak, hipotoniye sekonder olarak da gelişebilen yüksek damak, bilateral yarık dudak ve damak, velofaringeal yetmezlik ve laringomalazi MWS'de bildirilen diğer orofaringeal gastrointestinal bulgulardır.

2.2.5. Kardiyovasküler bulgular

Konjenital kalp hastalığı MWS hastalarının %52'sinde bildirilmiştir. Rapor edilen anomaliler arasında patent duktus arteriyozus (PDA) (16 hasta), atriyal septal defekt (ASD) (8 hasta), ventriküler septal defekt (VSD)(12 hasta), Fallot tetralojisi (5 hasta), pulmoner atrezi (2 hasta), pulmoner arteriyal *sling* (6 hasta) veya stenoz (13 hasta), aort koarktasyonu (AK)(4 hasta), bikuspit aort kapağı (1 hasta), mitral kapak prolapsusu (MVP) (1 hasta) ve aort stenozu (AS) (1 hasta) sayılabilir (1,4,8,12,20-24). MWS tanısı alan tüm hastaların ekokardiyografi ile değerlendirmesi önerilir.

Özellikle trakeal stenozla veya tek başına görülebilen pulmoner arteriyel *sling* kilinisyenlerin MWS tanısını akla getirmelerini sağlayabilecek nadir görülen alışılmadık bir konjenital kalp anomalisidir (8).

2.2.6. Genitoüriner- renal bulgular

Genitoüriner anomaliler MWS hastalarının yaklaşık %50'sinde tanımlanmıştır (3,4,9). MWS tanılı erkek hastalarda tanımlanmış genital anomaliler; hipospadias (%52), inmemiş testis (%36), bifid skrotum (3 hasta), mikropenis ve yelesi kordi şeklinde olabilir. Kız hastalarda tek bir hastada tanımlanmış vajinal septum dışında bildirilmiş bir genital anomali yoktur (3,4,6,14,25). Hipospadias, en sık görülen ürogenital anomali olarak çeşitli serilerde %46-56 sıklıkla tanımlanmıştır. Bu, herhangi bir çoklu konjenital anomali-zihinsel yetersizlik sendromu için yüksek bir orandır (3).

MWS'de görülebilen renal anomaliler, duplike böbrek, pelvik böbrek, vezikoüreteral reflü ve hidronefroz şeklindedir. Vezikoüreteral reflü ve hidronefroz %18-26 sıklıkla MWS'de görülebilen ikinci en sık ürogenital anomalidir (3,4,6,13,25) .

2.2.7. Kas iskelet sistemini ilgilendiren bulgular

MWS bulunan hastaların pek çoğu ince yapılıdır. El ve ayakları ilgilendiren minör malformasyonlar hastalarda sıktır. Ellerde tek palmar çizgi, ince, uçlara doğru incelen *tapering* parmaklar, nadiren parmak uçlarında belirgin fetal pedleri olabilir. Ayaklarda pes planus, hafif kalkaneovalgus deformitesi, eversiyon, metatarsus varus ve uzun ayak parmakları olabilir. Kafa grafisinde *wormian* kemik adacıkları, pektus ekskavatum, pektus karinatum, üstte pektus ekskavatum-altta karinatum şeklinde göğüs kafesi deformitesi, skolyoz, genu valgus, tekrarlayan non-travmatik patella dislokasyonu, kalça, dirsek ve dizlerde hafif kontraktür, ellerde ulnar

deviasyon, başparmakta radial deviasyon, kısa, geniş, proksimal yerleşimli başparmak, distal falankslarda hipoplazi, kamptodaktili, kemik yaşında gerilik, geniş uzun ayak baş parmağı, halluks valgus, ayak baş parmağında tek taraflı duplikasyon veya hipoplazi, ayak parmaklarında orta – distal falanks hipoplazisi ve üst üste binme gibi ekstremitte bulguları sık olmamakla beraber en az birer hastada tarif edilmiştir (4,10,11,13,15,26).

2.2.8. Göz bulguları

Yapısal göz anomalileri MWS hastalarının sadece %4 gibi küçük bir kısmında görülür (4) . Bildirilen bu yapısal anomaliler, mikroftalmi, iris/ retina/ optik disk kolobomu ve Axenfeld anomalisi şeklindedir. Kolobomu ve ileri derecede miyopisi olan bir hastada daha önce tanımlanmamış bir *ZEB2* missense mutasyonu ile beraber trizomi 21 bildirilmiştir (27). Bazı bebeklerde zamanla düzelen zayıf oküler fiksasyon ve nistagmus olabilir. Strabismus ve hipermetropi MWS hastalarında görülebilen yapısal olmayan fonksiyonel oftalmik bulgulardır. MWS'de fonksiyonel oftalmik bulguların görülme sıklığı ile ilgili oranlar literatürde bulunmamaktadır, ancak yayınlanan hasta fotoğrafları incelendiğinde pek çok hastada strabismus bulunması dikkat çekicidir. Ptozis, miyopi, astigmatizm, iris heterokromisi MWS hastalarında tanımlanmış diğer göz bulgularıdır (3,4,10,11,28,29).

2.2.9. İşitme ile ilgili bulgular

MWS'de tekrarlayan orta kulak iltihapları olabilir. İyi tedavi edilmemiş tekrarlayan orta kulak iltihaplarına bağlı iletim tipi işitme kaybı olabilir (4). Sensörinöral işitme kaybı MWS'nin bir bulgusu olarak tarif edilmemiştir. Sensörinöral işitme kaybı bulunan tek vaka mevcuttur ve bunun tesadüfen eşlik eden bir durum olduğu düşünülmüştür (9). Ancak, tanı alan tüm

hastaların odyolojik değerlendirmesi önerilir. Otolaringolojik muayene konuşma gecikmesi olan tüm hastaların değerlendirilmesinde gereklidir (3).

2.2.10. Cilt bulguları

Depigmentasyon, ve derin palmar ve plantar çizgilenmeler, bildirilmiştir (8,10,30,31). Depigmentasyon bildirilen üç vakanın birinde bu durum doğumda mevcut değildir, zaman içinde gövdede, yağmur damlası şeklinde gelişmiştir (11,13). Ayrıca aksesuar memesi olan üç hasta ve kulak önünde *skin tag* bulunan bir hasta bildirilmiştir (1,12).

2.2.11. Diş anomalileri

MWS hastalığının karakteristik diş bulguları çok iyi tanımlanmış değildir. Geniş aralıklarla yerleşmiş dişler, malpozisyon, üst üste binen kalabalık dişler ve gecikmiş diş sürmesi gibi bulguların tanımlandığı en az birer hasta literatürde mevcuttur (4,12,29).

2.2.12. Diğer klinik bulgular

Geç başlangıçlı otonomik disregülasyonu olan bir hasta, dalağı olmayan bir hasta, ve epilepsi ile de ilişkili olabilecek tekrarlayan kusma atakları olan 5 hasta bildirilmiştir (6,8,22,30).

Tablo 2.2'de klinik bulgular yaşa göre ve görülme sıklıkları ile birlikte özetlenmiştir.

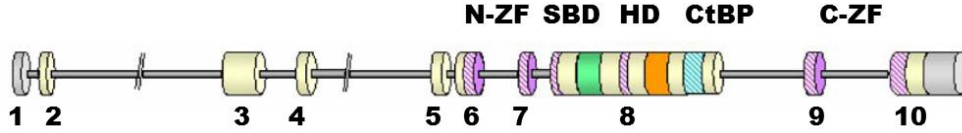
Tablo 2.2. MWS'de literatürde bildirilmiş klinik bulgular ve sıklık oranları (3,9).

Sabit bulgular (~ % 100)
Tipik yüz görünümü (%98) Regresyon göstermeyen ağır gelişme geriliği (%100) Konuşma bozukluğu (%100) Hiç konuşmama veya sınırlı kelime dağarcığı, daha iyi reseptif dil ve sözel olmayan iletişim yeteneği ile beraber
Sık görülen bulgular (> % 80)
Mikrosefali (%80) Nöbet (%74) Mutlu sosyal davranış biçimi Yürüme gecikmesi
Hastalıkla ilişkili bulgular (% 20-80)
Hirschsprung hastalığı (%54) Çoğunlukla doğumdan kısa süre sonra tanı alır, geç tanı alan kısa segment HCSP vakaları mevcuttur. Konjenital kalp anomalisi (%54) Ürogenital/renal anomaliler (%52) Hipospadias (%56) İnmemiş testis (%37) Renal anomaliler (%13) Kısa boy (%50) Korpus kollozum agenezisi veya hipoplazisi (%46) Kabızlık (%30) Uyku bozukluğu
Sık olmayan bulgular (< % 10)
Pilor stenozu (%5) Strabismus Yapısal göz anomalileri (%4) Yarık dudak/damak (%3) Ciltte hipopigmentasyon Otonomik disfonksiyon Aspleni Duplike ayak başparmağı Nöronal migrasyon defekti (pakigiri) Pulmoner arteriyal <i>sling</i> (trakeal stenoz ve hipoplazi ile beraber olabilir) (%3)

2.3. ETYOLOJİ, PATOGENEZ VE GENETİK

Mowat ve ark. 1998 yılında MWS'nin 2q21-q23 lokusuna lokalize bir genetik değişiklik sonucu oluştuğunu belirtmiştir (1). Kesin olarak *Zinc Finger E-box binding homeobox 2* (ZEB2), (OMIM#605802), (daha önce *ZFHX1B* veya *SIB1* olarak da anılıyordu), geninin dominant kalıtılan heterozigot delesyon veya mutasyonu sonucu oluştuğu, ilk kez 2001 yılında tanımlanmıştır (2,30).

ZEB2 geni, 10 ekzon, 9 intron içerir (Şekil 2.5), *Smad interakting protein 1* (SMADIP1,SIB1) proteinini kodlar (2). Genin başlangıç kodonu ekzon 2'de, sonlandırma kodonu ekzon 10'da bulunur. Smad proteinleri *transforming growth faktör-β* (TGF-β) sinyalizasyon yolağında önemli rol oynayan sitoplazmik mediatörlerdir.



Şekil 2.5. *ZEB2* geni, genomik organizasyonu, kodlanan ekzonlar (ekzon 2-10) ve fonksiyonel domainler.

(N-ZF: N-terminal kısım, SBD: Smad bağlayıcı domain, HD: Homeodomain benzeri dizi, CtBP: ve C-terminal bağlayıcı protein, C-ZF: C-terminal kısım).

Hücre yüzeyinden nukleusa kadar uzanan *TGF-β* sinyal yolağı, çok çeşitli hücre tiplerinde geniş biyolojik etkinlik spektrumu olan diferansiyasyon ve apoptoziste, embriyonel gelişim-farklılaşmada, erişkinde doku tamiri, hücre büyümesi ve immünmodülasyonda kritik roller oynayan sitokinler içerir. *ZEB2/ SIB1* gen regülasyonunun doğru bir şekilde olması tüm organizmanın normal gelişim ve yapısal farklılaşması için gereklidir. Literatürde *ZEB2*

proteinlerinin kritik yollarda transkripsiyonel represör olarak davrandığını gösteren pek çok yayın mevcuttur. *TGF- β* sinyalizasyon yolağında *SIB1* proteini bir zinc finger / homeodomain transkripsiyonel baskılayıcı olarak davranır. *SIB1*, 1215 aminoasitten oluşan kompleks multi domain bir proteindir. Smad bağlayıcı domain (SBD), homeodomain benzeri dizi (HD) ve C-terminal bağlayıcı protein (CtBP) gibi domainlerden oluşur, amino ve karboksiterminallerinde N-terminal kısım (N-ZF) ve C-terminal kısım (C-ZF) gibi iki ayrı *zinc finger* kümesi bulundurur (3). *SIB1*, *two-handed zinc finger homeodomain* protein ailesinin bir üyesidir, *TGF- β* sinyalizasyon yolağında transkripsiyonel *ko-represör* olarak davranır ve *bone morfogenetik protein 4* aktivitesi için gereklidir (8). Her *zinc finger* kümesi hedef genin promoter bölgesine bağlanarak gen ekspresyonunu düzenler. Örneğin *$\alpha 4$ -integrin* ve *E- katedrin* gibi gen ekspresyonunu baskılar. Ayrıca *nukleozom remodeling* ve *histon deasetilasyon kompleksi*nde transkripsiyonel aktivatör olarak da davrandığı, Smad aracılı sinyalizasyon kaskadını reseptör aracılı aktive ettiği gösterilmiştir (32) . *ZEB2/ SIB1*, direk DNA' ya bağlanarak veya histon modifiye edici enzimlerle kompleks yaparak transkripsiyonu baskılayabilir, ancak doku spesifik transkripsiyonel baskılayıcı-aktive edici moleküler mekanizma tam olarak bilinmemektedir (35). *SIB1* proteinin fonksiyonu embriyonik nöral krest gelişiminde, sefalik, kardiyak, vagal seviyelerde, gastrulasyon ve mezodermal gelişimde önemlidir. *SIB1* disfonksiyonu, Smad aracılı sinyalizasyon kaskadında ve/veya hedef genlerin transkripsiyonunun baskılanmasında disfonksiyona yol açar. *SIB1* proteini santral sinir sistemi miyelinizasyonu ve oligodendrosit diferansiyasyonu için gereklidir (33). Bir başka transkripsiyon regülatör faktör olan *ZEB1* fonksiyonel açıdan ve ekspresyon paterni bakımından *ZEB2*'den farklıdır (34). *ZEB2* geni farklı transkript varyantları olan kompleks bir gen dir, evrimsel olarak yüksek oranda korunmuştur, fazla polimorfizm tanımlanmış bir gen değildir, yapısındaki küçük değişiklikler fonksiyon kaybına sebep olur. Pek çok embriyolojik dokuda eksprese edilir, *ZEB2* geni mRNA'sı hemen tüm insan dokularında tespit edilmiştir (35). *ZEB2* gen fonksiyonlarının embriyolojik gelişiminde önemli olduğu gösterilen dokular; nöral krestten köken alan hücreler (enterik

sinir sistemi, kraniyofasiyal mezoektoderm, SSS, kardiyak septum (patent duktus arteriozus, ventriküler ve atriyal septum), kıkırdak, kemik, kas oluşumu ve hematopoetik hücre gelişimi ile orta hat yapıları (korpis kallozum ve genitalya) olarak sıralanabilir (3,4,36). Hayvan deneyleri ile *ZEB2* geninin kortikal nörogenezis, hipokampal formasyon ve miyelinizasyonda rolü olduğu, *ZEB2* disfonksiyonunun nefrogeneziste gerileme yaptığı ve gen fonksiyonlarının regülatör sekanslar tarafından doku ve yaşa özgül olarak düzenlendiği gösterilmiştir (34). *ZEB2* gen disfonksiyonunun insanlarda malformasyon ve kanser ile ilişkisi bilinen bir durumdur (36).

Tüm tipik MWS vakaları *ZEB2* geni haployetmezliği (tek allelin fonksiyon görmemesi) sonucu oluşur (5). Embriyogenezin pek çok basamağında rol alan ve *TGF-β* sinyal yolağında Smad proteinleri aracılığı ile transkripsiyonel baskılayıcı olarak fonksiyon gören *ZEB2* yaklaşık 120 kb uzunluğundadır ve 10 ekzona bölünmüştür. 3,642 bp uzunluğunda olan kodlanan bölgeler ikinci ekzondan başlar ve 1215 amino asit uzunluğundaki multi-domain *SIB1* proteinini kodlar. MWS hastalarının %70-80'inde direk dizi analizi yapılarak hastalıktan sorumlu mutasyon tespit edilebilir. Tespit edilen mutasyonların %50'si ekzon 8 de bulunur ve ekzon 8, genin kodlanan kısmının neredeyse yarısını kaplayan en geniş ekzondur (Şekil 2.5) (5).

MWS hastalığına sebep olabilen *ZEB2* gen mutasyonu spektrumu geniştir. *ZEB2* geninin tamamını ve ardışık genleri içeren sitogenetik olarak tespit edilebilen büyük delesyonların ve translokasyonların görülme oranı %1,8-2; standart sitogenetik analizle tespit edilemeyen *multiplex ligation dependent probe amplification* (MLPA) veya FISH tekniği ile gösterilebilen daha küçük boyutta tam veya parsiyel gen delesyonlarının görülme oranı %19-20 olarak bildirilmiştir. Yüzde 70-80 oranla en sık görülen *ZEB2* gen defekti, fonksiyon kaybettirici tipte *ZEB2* gen mutasyonlarıdır. Dizi analizi ile saptanabilen küçük insersiyon ve delesyonların sebep olduğu bu mutasyonlar %41,5 oranında çerçeve kayması (*frameshift*), veya %31,6 oranında erken stop kodon (*non-sense*) oluşumuna sebep olan *truncating* mutasyonlar şeklindedir. Tek baz değişimi sonucu oluşan *missense*

mutasyonlar %1,7; küçük delesyon ve duplikasyonların birlikte bulunduğu kompleks mutasyonlar %1,2 ve *splice site* mutasyonlar %2,3 oranla çok daha nadir olarak görülür (4,9,37). Sonuç olarak mutasyonların yaklaşık % 80'i direk dizi analizi yöntemi ile saptanabilecek *nonsense* veya *frameshift* mutasyonlardır ve kodlanan tüm ekzonlarda görülebilmekle beraber mutasyonların %67'si en büyük ekzon olan ekzon 8'e yerleşmiştir (5). Ekzon 8'de 2083C>T, 2761C>T ve 1027C>T ve ekzon 7'de 904C>T gibi bazı mutasyonların literatürde sık tekrar ettiği bildirilmiştir (6,8).

Her ne kadar 2q22 lokusunda *ZEB2* geninin tamamını ve ardışık genleri içeren sitogenetik olarak tespit edilebilen delesyonların MWS fenotipine yol açtığını gösteren vaka raporları mevcut olsa da, MWS bir ardışık gen sendromu değildir, sadece *ZEB2* geninin haployetmezliği (tek allelinin fonksiyon görmüyor olması) MWS fenotipinin ortaya çıkması için yeterlidir (10).

ZEB2 gen dizisi fazla polimorfizm göstermez, evrimsel olarak yüksek düzeyde korunmuştur, dizideki küçük varyasyonlar bile protein fonksiyonunu tehlikeye atabilir (6) . *ZEB2* gen polimorfizmi ile ilgili literatürde fazla çalışma olmamakla beraber, 60 MWS klinik bulgulu, 120 etkilenmemiş sağlıklı bireyin incelendiği bir araştırmada her iki grupta %20 oranında ekzon 7, c.917-21T>C değişikliği saptanmış ve polimorfizm olarak yorumlanmıştır. Ayrıca p.Ile163Ile, ekzon 8'de p.Pro714Leu ve ekzon 10'da p.Glu1094Lys literatürde hastalıktan sorumlu olmayan polimorfik olarak tanımlanmış diğer değişikliklerdir (8).

Tipik klinik bulguları gösterip, kuvvetle MWS düşünülen hastaların %10 kadar bir grubunda mutasyon veya delesyon tarif edilememiştir. Genetik testin negatif çıktığı bu hasta grubunda genetik heterojenite veya atipik mutasyonlar sözkonusu olabilir. Bu hasta grubunda klinik tanı geçerlidir (4,13,37).

MWS'de genotip-fenotip ilişkisini araştıran çalışmalarda delesyon gösterilen vakalarla, *truncating* mutasyon (çerçeve kayması şeklinde

mutasyon oluşturan veya erken stop kodon oluşturarak transkripsiyonun düzgün işleyişini durduran) olan vakaların benzer klinik bulguları olduğu gösterilmiştir (6,10,15). Ancak sitogetik olarak tespit edilebilen büyük delesyonu olan hastaların (>5 Mb) daha ciddi klinik fenotip ve ilave bulguları olabileceği belirtilmektedir (15,22,38). MWS'de psikomotor gerilik ile beraber tipik yüz bulguları sabit bulgu olmak üzere HCSP, doğumsal kalp hastalığı ve korpus kallozum agenezisi gibi ciddi malformasyonlar ve nöbet değişik derecelerde saptanabilen diğer bulgulardır. Klinik bulgular ve altta yatan moleküler defekt karşılaştırıldığında, aynı R695X mutasyonunu taşıyan birbirinden farklı 8 hastanın klinik bulgu şiddetinin değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir (4,10). Klinik bulguların şiddetindeki değişkenlik sadece aynı mutasyon için değil, aynı aile içindeki etkilenmiş bireyler için de söz konusudur (39). Bu durumdan, modifiye edici genetik faktörler sorumlu tutulmuştur (6). Aynı mutasyonla, birbirine benzer ve farklı klinik bulguları olan vakalar bildirilmiştir (8). İntragenik truncating mutasyonun tipi veya lokalizasyonu ile klinik bulguların şiddeti arasında herhangi bir genotip-fenotip ilişkisi yoktur. Nadir görülen mutasyonlar tipik olmayan fenotipik bulgulara yol açabilir, ancak literatürde nadir görülen klinik bulgularla ilgili genotip-fenotip ilişkisi tanımlanmamıştır (8). Proteinlerin fonksiyonel domainlerinin korunmasını sağlayan atipik mutasyonlar atipik fenotipe yol açabilir. Tipik fasiyal bulguları olan ancak hafif motor ve konuşma geriliği dışında herhangi bir ciddi malformasyonu veya nöbeti bulunmayan bir hastada ekzon 2'de 5' *UTR splice site* mutasyonu tespit edilmiştir (40). Bu bulgu ile yazarlar MWS'de fasiyal fenotipin oluşmasında ekzon 2'nin belirleyici fonksiyonu görebileceğini öne sürmüşlerdir (40).

Sonuç olarak atipik mutasyonu olan (*missense, splice site*) az sayıda (%2,4) hastanın atipik klinik bulguları olabilir, tanının doğrulanması *ZEB2* genini ilgilendiren mutasyon, delesyon veya translokasyonun gösterilmesine bağlıdır, ve moleküler tanısı doğrulanan hasta sayısı arttıkça genotip fenotip ilişkisi konusundaki bilgi birikimi artacaktır (4).

2.4. TANISAL METODLAR

Tanısall süreç hastalığa özgü fenotipik bulguların farkedilip MWS'den şüphelenilmesi ile başlar. Tipik fasiyal bulgular tanı için önemli ipucudur. HSCP, konjenital kalp hastalığı ve korpus kallozum agenezisi gibi ciddi doğumsal malformasyonlar sıklıkla görülür, ancak her zaman olmayabilir. Nöbet sık bir bulgudur. Ağır psikomotor gerilik ise sabit klinik bulgudur. MWS'den şüphelenilen tüm vakalara *ZEB2* gen defektini göstermek için moleküler analiz yapılmalıdır. MWS'nin karakteristik yüz görünümü zihinsel yetersizlik ile birlikte olduğunda HSCP olmasa bile *ZEB2* mutasyon analizi istemek için yeterlidir.

MWS'den şüphelenilen tüm hastalara büyük delesyon ve translokasyonları dışlamak için sitogenetik analiz yapılmalıdır. Bu şekilde 2q21-q23 lokusunda *ZEB2* geninin sitogenetik olarak tespit edilebilen 5 Mb'den daha büyük delesyonlar ve translokasyonlar tespit edilmiş olur (%1-2) (37).

Standart sitogenetik analizle tespit edilemeyen daha küçük boyutta tam veya parsiyel gen delesyonları *multiplex ligation dependent probe amplification* (MLPA) tekniği ile %2, veya FISH analizi ile %15 gösterilebilir. FISH ile 1-5 Mb arası, MLPA veya kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) ile 1 Mb'den daha küçük delesyonları tespit etmek mümkündür. 1 Mb'den daha küçük delesyonlar mikrodizin bazlı yöntemlerle de tespit edilebilir. *Array-Comparative Genomic Hybridization* (array-CGH) analizi ile *ZEB2* gen delesyonlarının bildirildiği vakalar mevcuttur (19,41,42). Farklı tekniklerle gösterilebilen submikroskopik tam veya kısmi ekzon delesyonuna bağlı *ZEB2* gen disfonksiyonu, genetik defekt gösterilebilen vakaların %19,3'ünü kapsar (29,37).

En sık görülen *ZEB2* gen defekti, fonksiyon kaybettirici tipte *ZEB2* gen mutasyonlarıdır. *ZEB2* gen mutasyonlarının %70-80 kadarı doğrudan dizi analizi yöntemi ile saptanabilir. Bu mutasyonlar en çok erken stop kodon oluşumu veya çerçeve kayması nedeniyle protein sentezini durduran

mutasyonlardır, ayrıca kodlanan tüm ekzonlarda görülebilmekle beraber mutasyonların %67 kadarı en büyük ekzon olan ekzon 8'e lokalizedir (3,37).

Verilerin doğrulanması için, güvenilir yeterli sayıda prob içeren MLPA veya *array-CGH* sonuçlarının alternatif metodla doğrulanmasına gerek yoktur ancak delesyon görülen prob sayısı yeterli ya da güvenilir değilse qPCR, FISH, farklı MLPA problemleri veya daha yüksek çözünürlüklü mikrodizin ile sonuçların doğrulanması gereklidir. Eğer FISH ile gösterilen sonuç mozaik patternde ise, sonuçlar moleküler tekniklerle doğrulanmaya çalışılmalıdır. Eğer MLPA ile tek ekzonda delesyon görülmüş ise sonuç real-time qPCR ile onaylanmalı, geri kalan ekzonlar için ise olası mutasyon veya polimorfizmin tespiti açısından dizi analizi yapılmalıdır. Dizi analizi ile saptanan bir değişikliğin doğrulanması için çift yönlü dizileme, sağlıklı anne babanın analizi ve değişen protein yapısının oluşturacağı fonksiyonel hasarın araştırılması önerilir (37). Klinik bulguları kuvvetle MWS ile uyumlu olduğu halde, dizi analizi ile hastalıktan sorumlu olabilecek değişiklik saptanmayan hastalara *MLPA* veya *array-CGH* ile analiz önerilir, ayrıca *array-CGH* yapılarak ayırıcı tanıda yer alabilecek diğer delesyon/duplikasyon sendromları da tanınmış, dışlanmış olur (37).

MWS ile uyumlu tipik klinik bulguları olan hastaların yaklaşık %10 gibi bir grubunda hastalıktan sorumlu mutasyon-delesyon gösterilememiştir (37) . Bu durumdan atipik genetik defekt veya başka modifiye edici faktörler, gen fonksiyonunun regülasyonunu etkileyebilecek bir regülatör mutasyon veya somatik mozaikizm söz konusu olabilir. Bu hastalarda tanı klinik bulgularla konur (37). Henüz MWS genetik etyolojisinden sorumlu olabilecek alternatif bir genetik lokus olduğuna dair bir kanıt mevcut değildir. Klinik tanıyı doğrulamak için istenen genetik test mutlaka hastaya-aileye genetik danışma eşliğinde verilmelidir.

MWS'de genetik testin analitik duyarlılığı %90, özgüllüğü %100'dür. Testin klinik özgüllüğü de %100 dür. Klinik olarak MWS düşünülmeyen hastalarda genetik test negatiftir. Mozaik olmayan *ZEB2* gen mutasyonları

%100 tam penetrans gösterir ancak klinik bulguların şiddeti değişkendir. MWS'de genetik test, tanı/ayırıcı tanı, aileye prenatal tanı imkanının sunulması ve akrabalar için risk tahmini yapılması açısından faydalıdır. MWS tanısında kullanılabilecek genetik testler Tablo 2.3'te özetlenmiştir.

Tablo 2.3. MWS tanısında kullanılabilen genetik testlerin özeti (3,4,29,37) .

Gen	Test Yöntemi	Tespit edilen değişiklik	Yöntemin algılama frekansı (%)	
ZEB2	Sitogenetik	Mikroskobik delesyonlar	2	19,3
	<i>FISH</i>	Submikroskobik delesyonlar	15	
	<i>MLPA</i> <i>qPCR</i>	Orta boyutlu delesyon/duplikasyonlar	2	
	Dizi analizi	<i>Frame shift</i> mutasyon	41,5	70-80
		<i>Nonsense</i> mutasyon	31,6	
		<i>Splice site</i> mutasyon	2,3	
		<i>Missense</i> mutasyon	1,7	
		Kompleks mutasyon	1,2	

2.5. GENETİK DANIŞMA VE PRENATAL TANI

Genetik analiz sonuçları aileye genetik danışma eşliğinde verilir. Aileye verilecek genetik danışma tekrarlama olasılığı ve prenatal tanı imkanı gibi bilgileri de içermelidir.

MWS tipik olarak otozomal dominant *de novo* ZEB2 gen mutasyonları sonucu oluşur, vakaların çoğu sporadiktir dolayısıyla tekrar riski düşüktür. Literatürde bugüne kadar 3 ailede hastalığın kardeşlerde tekrarladığı

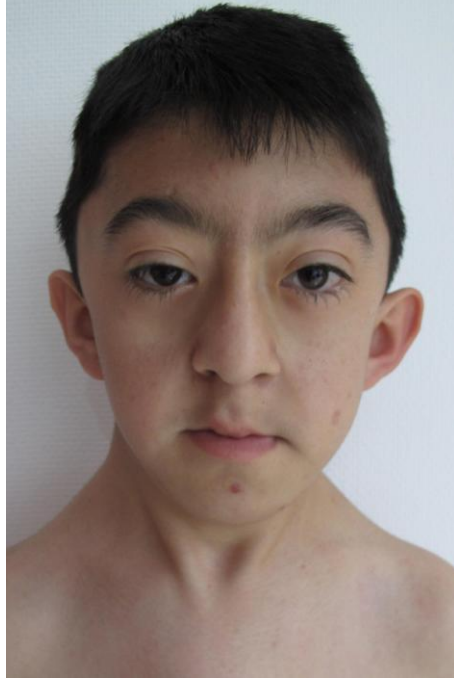
bildirilmiştir (6,20,39). Bu durum germ hücre mozaisizmine bağlanmıştır. Aynı aile için tahmini tekrarlama riski olasılığı germ hücre mozaisizmi sebebiyle %1-2 olarak verilmiştir.

Aile için kesin prenatal tanı imkanı ancak indeks vakanın tanısı sitogenetik veya moleküler olarak onaylanmışsa mümkündür. Eğer aile içinde daha önce tanımlanmış bir MWS vakası yoksa, prenatal ultrasonografi ile tanı alabilecek hastalığa spesifik bir görüntüleme bulgusu yoktur. Takip eden gebelikler için korpus kallozum agenezisi veya konjenital kalp hastalığı gibi hastalıkla uyumlu olması olası şüphe uyandıracak bulgular prenatal ultrasonografi ile takip edilebilir. Ailede indeks vaka olmadan, *array-CGH* analizi ile prenatal tanı alıp terminasyona yönlendirilmiş vaka mevcuttur (42). Olası dengeli translokasyon taşıyıcılığını dışlamak için indeks vakanın anne babasına sitogenetik analiz önerilir, ancak diğer sağlıklı aile bireyleri için genetik test yapma endikasyonu yoktur (3,36). Eğer ebeveynden birinde dengeli yapısal kromozom anomalisi varsa, tekrarlama riski yapısal bozukluğun tipine özel olarak belirlenir. Prenatal tanı ebeveynin takip eden gebelikleri için önerilir, ancak daha uzak akrabalık derecesi bulunan diğer aile fertleri için prenatal tanı açısından tıbbi bir gereklilik yoktur.

2.6. AYIRICI TANI

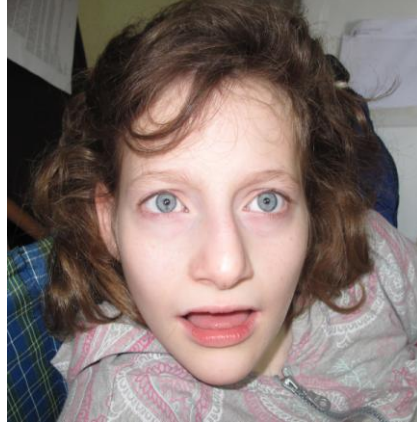
MWS'nun ayırıcı tanısında öncelikli olarak Goldberg-Shprintzen megakolon sendromu (MIM # 609460) yer alır. Goldberg-Shprintzen megakolon sendromu ve MWS için HCSP, mikrosefali zihinsel yetersizlik ve epilepsi ortak bulgulardır. Goldberg- Shprintzen megakolon sendromu 10q22'de lokalize otozomal resesif kalıtılan bir hastalık olup, *KIAA1279* gen mutasyonu sonucu oluşur (43). Geçmişte bazı MWS hastaları yanlışlıkla Goldberg-Shprintzen megakolon sendromu olarak bildirilmiştir (3) . Yüksek-belirgin burun kökü, sinofris, uzun kıvrık kirpikler, palpebral pitozis ve yarık damak gibi dismorfik bulgular ve kortikal anomali olarak bilateral diffüz serebral polimikrogiri, Goldberg-Shprintzen megakolon sendromunu

MWS'den ayıran bulgulardır (44) . Ayrıca MWS'de görülen korpus kallozum agenezisi ve hipospadias, Goldberg-Shprintzen megakolon sendromunda bildirilmemiştir (3).



Şekil 2.6. Goldberg- Shprintzen megakolon sendromunda dismorfik bulgular (Fotoğraf kaynağı-HÜTF Çocuk Genetik bölümü arşivi).

MWS ayırıcı tanısında yer alan bir diğer hastalık Angelman sendromudur. Angelman sendromunun etyolojisinde %70-75 *de novo* maternal 15q11-13 delesyonu, %2 aynı bölgenin paternal uniparental dizomisi, %2 imprint merkezi mutasyonu, %5-10 *E3 ubiquitin* protein ligaz gen mutasyonu sorumludur . Her iki sendromda da sık gülümseyen mutlu yüz ifadesi, yüz ve çenenin yukarıya doğru tilt yapması, dirseklerde fleksiyon postürü, açık ağız ifadesi, belirgin gamzeli çene ve ataksik yürüyüş ortak bulgulardır, ancak MWS karakteristik tipik yüz görünümü ile ayırt edilebilir (Şekil 2.7). Ayrıca Angelman sendromlu hastalarda çoğunlukla çoklu doğumsal anomali ve HSCP yoktur.



Şekil 2.7. Angelman sendromu fasiyal dismorfik bulgular (Fotoğraf kaynağı- HÜTF Çocuk Genetik bölümü arşivi).

Gelişme geriliği, nöbet ve edinilmiş mikrosefalisi olan kız hastalarda ayırıcı tanıda Rett sendromu da (Şekil 2.9.a) yer alır, ancak Rett sendromunda ilk 6-18 aylık periyotta gelişim normaldir ve MWS ile uyumlu tipik fasiyal dismorfik bulgular mevcut değildir.

Pitt-Hopkins sendromu (Şekil 2.8.d) ve Rubinstein Taybi (Şekil 2.8.b) sendromu da zihinsel yetersizlik, mikrosefali ve HSCP görülebilen diğer sendromlardır, ancak fasiyal dismorfik bulguların farklılığı ile ayırt edilebilirler (3).

Smith Lemli Opitz sendromu (Şekil 2.8.c), 11q12-13 lokusunda yer alan 7-dehidrokolesterol redüktaz enzimini kodlayan *DHCR7* geninin mutasyonları sonucu oluşan otozomal resesif bir hastalıktır. Ağır zeka geriliği ve hipospadias bulgusu MWS ile ortaktır, ancak bu hastalıkta hipokolesterolemi olur ve dismorfik bulguları MWS'den farklıdır.

Opitz G (Şekil 2.8.e) sendromu zeka geriliği, hipertelorizm ve hipospadias bulguları ile; X'e bağlı α talasemi-zihinsel yetersizlik sendromu (Şekil 2.8.f) da farklı klinik fenotipik bulguları ile MWS ayırıcı tanısında yer alır ancak, farklı dismorfik ve her bir sendroma özgün diğer bulgular ile ayırıcı tanı yapmak mümkündür (3).



Şekil 2.8. Farklı dismorfik - klinik bulguları ile MWS ayırıcı tanısında yer alan diğer dismorfik sendromlar; **a.** Rett sendromu, **b.** Rubinstein Taybi sendromu, **c.** Smith-Lemli-Opitz sendromu, **d.** Pitt-Hopkins sendromu, **e.** Opitz G sendromu, **f.** X'e bağlı α talasemi-zihinsel yetersizlik sendromu (3) . (Şekil 2.8 a-e Fotoğraflar HÜTF çocuk genetik bölüm arşivine aittir).

MWS ayırıcı tanısında ayrıca HSCP hastalığının diğer sendromik ve sendromik olmayan formları da yer alır (45).

2.7. YAKLAŞIM, TEDAVİ VE PROGNOZ

MWS'de nöral defekti ve diğer malformasyonlar erken embriyonik gelişim sırasında oluşur ve kesin bir tedavisi yoktur. Ciddi gelişme geriliği ve doğumsal malformasyonları olan tüm hastalarda olduğu gibi erken müdahale

ve soruna yönelik yaklaşım stratejisinin hastaların genel sağlık durumu ve yaşam kalitesi üzerine olumlu etkisi büyüktür. MWS'de diğer pek çok kompleks multisistem hastalıkta olduğu gibi iyi multidisipliner yaklaşımda pek çok farklı tıbbi ve cerrahi branşın işbirliğine ihtiyaç vardır. Ailelerin iyi bir genetik danışma verilerek hastalık hakkında yeterli bilgilendirilmesi tıbbi yaklaşımın ilk ve en önemli basamağıdır. MWS nadir ve göreceli olarak yeni tanımlanmış bir sendrom olduğundan klinik komplikasyonların anlaşılması ve hastalığın doğal seyrinin tanımlanması halen devam eden bir süreçtir. Hastalıkla ilgili artan bilgi birikiminin ve gelişen yaklaşım stratejilerinin hastaların yaşam kalitesini olumlu şekilde etkilemesi ümit edilmektedir.

Hastalara tanı anında genel pediatrik değerlendirme, dismorfik muayene ve ailelerin hastalıkla ilgili bilgilendirilmesi sürecinin ardından temel pediatrik kardiyoloji muayenesi, ekokardiyografi, işitme testi, göz muayenesi; pediatrik diş muayenesi, hastanın kronik kabızlık ve diğer gastrointestinal problemler yönünden sorgulanması, detaylı nörolojik muayene ve nöbet öyküsünün sorgulanması; olası renal anomali açısından ultrasonografik inceleme, özellikle erkek hastalarda inmemiş testis ve hipospadias açısından detaylı genitoüriner muayene, skolyoz, pektus deformitesi, ayak/ayak bileği malpozisyonu gibi anomaliler açısından detaylı kas iskelet sistem muayenesi yapılmış olmalıdır. Takip eden kontrollerde sistem sistem probleme yönelik yaklaşım yapılır.

Beslenme öyküsü alınmalı ve büyüme parametreleri her kontrolde izlenmelidir. MWS olan hastalara özel büyüme eğrisi yoktur, bu nedenle standart eğriler kullanılır. Ciddi beslenme problemi varsa orofaringeal görüntüleme/endoskopi gerekir. Hekim-diyetisyen gözetiminde hastaya beslenme desteği verilir. Yarı damak sözkonusu ise hasta plastik-orofasiyal cerrahiye yönlendirilir.

Hastaya özel farklı bir durum sözkonusu olmadıkça MWS'de rutin çocukluk çağı aşılarının tamamı yapılabilir. Rutin kontrollerde aşılardan eksik kalmamış olmasına dikkat edilmelidir.

Hastaların tamamının erken bebeklik döneminden itibaren gelişme basamakları yakından izlenmelidir. Fonksiyonel yetiler ve konuşma becerisi takip edilmeli, gelişimin yavaşlamasına veya davranış değişikliğine sebep olabilecek akut sistemik fiziksel sebepler sorgulanmalıdır. Hastalara konuşma terapisi ve fizyoterapi imkanları sunulmalı, tuvalet eğitimi gibi konularda ailelere sabırlı ısrar stratejisi, iletişimin artırılması için resimli –şarkılı eğitim, çiğneme, ısırma, kemirme gibi oral davranışları olan hastalar için güvenli çiğneme objeleri sağlanması, ev güvenliğinin sağlanması, okul çağındaki çocuklara özel eğitim desteği sağlanması ve ergoterapi (kişilerin günlük yaşam aktivitelerine katılımını sağlamak amacıyla anlamlı ve amaçlı aktivitelerle fonksiyon kaybını aşmaya yönelik özel becerilerin geliştirilmeye çalışılması) önerilir.

Neonatal intestinal obstrüksiyon öyküsü veya HSCP her zaman yenidoğan döneminde bulgu vermeyebileceği için, ciddi kabızlık HCSP hastalığı yönünden rektal biyopsi ile araştırılmalıdır. Biyopsi negatif vakalar için fonksiyonel dismotiliteyi göstermek açısından baryumlu grafi veya anorektal manometri faydalı olabilir. Pilor stenozu bulgusu varsa, pilorik ultrasonografi; gastroösefajiyal reflü şüphesi varsa üst gastrointestinal sistem endoskopisi yapılmalıdır. HCSP varlığında standart cerrahi yaklaşım gereklidir. İntestinal dismotilite operasyon sonrası sebat edebilir. Pilor stenozu için standart piloroplasti, reflü için medikal tedavi önerilir.

Gelişim basamaklarında herhangi bir kayıp veya gerileme hastaların nöbet açısından araştırılmasını gerektirir. Nöbet öyküsü olan hastalar mutlaka elektroensefalogram ile değerlendirilmeli ve antikonvülzan tedavi protokolü uygulanmalıdır. Mikrosefali tek başına kraniyal görüntüleme yapma endikasyonu değildir, ancak korpus kallozum agenezisi bulunup bulunmadığını göstermek prognozu değiştirmese de iyi bir tanısal ipucudur.

MWS tanısı alan tüm hastalar ekokardiyografi ile olası kalp hastalığı açısından değerlendirilmeli, herhangi bir anomali saptanması halinde kardiyoloji bölümü ile birlikte tedavi ve takip edilmelidir.

MWS tanısı alan tüm hastaları bazal renal ultrasonografik değerlendirmesi, özellikle erkek hastaların dikkatli genitoüriner muayenesi yapılmalıdır. Tekrarlayan üriner sistem enfeksiyonları söz konusu ise olası vezikoüreteral reflü varlığını göstermek için işeme sistoüretrografisi yapılmalı, vezikoüreteral reflü saptanırsa hasta bir pediatrik nefrolog ve üroloji uzmanı ile birlikte izlenmelidir.

Bazal göz muayenesinde anomali saptanması halinde anomali tipine göre oftalmolojik kontrol-takip gereklidir.

MWS'de sensorinöral işitme kaybı bildirilmemiştir, ancak konuşma bozukluğu etiyolojisinin aydınlatılması açısından işitme testi ile işitme kaybı olmadığı gösterilmelidir. Hastalarda tekrarlayan otite bağlı olarak iletim tipi işitme kaybı olabilir. Hastaların iletişim yeteneklerinin daha da bozulmaması için herhangi bir şekilde işitme kaybı saptanması durumunda gerekli tıbbi-cerrahi tedavi takip yapılmalıdır.

Özellikle, yürümeye başlayan hastalar ayak-bilek malpozisyonu açısından iyi değerlendirilmeli, herhangi bir kas iskelet anomali saptanan hastalar ortopedi bölümü ile birlikte değerlendirilmelidir.

MWS hastalarının sağkalım oranları ile ilgili bilinenler oldukça sınırlıdır. Sitogenetik olarak gösterilebilen büyük bir delesyonu olan, yenidoğan döneminde nöbet ile kaybedilen bir hasta ve aortik valvuler stenozu olan bir başka hastanın hayatın ilk birkaç ayı içerisinde kaybedildiği bildirilmiştir (8,15) . Literatürde bu sendrom ve komplikasyonları yüzünden öldüğü bilinen bir diğer hasta da, *missense* mutasyonu olan 3 yaşında bir kız hastadır (8).

3. HASTALAR VE YÖNTEM

3.1. HASTALAR

Çalışmamıza zihinsel yetersizlik ve dismorfik bulguları olup, eşlik eden klinik özellikleri nedeniyle MWS tanısı düşünülen hastalar dahil edilmiştir. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Çocuk Genetik Bölümü'nde son 10 yılda MWS ön tanısı ile izlenen 25 hasta bulguları ve fotoğrafları arşivden taranıp, bölüm içi konseyde değerlendirilmiş, mental retardasyon ve tipik yüz görünümü ile beraber MWS ile kuvvetle uyumlu olabilecek dismorfik ve klinik bulguları olan hastalardan ebeveyni çalışmaya katılmaya onay veren 10 hasta çalışmaya alınmıştır.

MWS ile uyumlu olabilecek şu dismorfik ve klinik özellikleri bulunduran hastalar çalışmaya dahil edilmiştir:

- Karakteristik yüz görünümü (mutlu yüz ifadesi; yüksek alın, uzun yüz; frontal belirginleşme; medial açılma gösteren, orta bölümü seyrek, geniş kaşlar; derin yerleşimli iri gözler; büyük ve kalkık kulak memesi; kemerli burun; belirgin dairesel burun ucu; belirgin kolumella; M-şeklinde üst dudak; açık ağız ifadesi; belirgin-üçgen-gamzeli çene),
- Mikrocefali (doğumdan itibaren veya sonrasında),
- Orta ağır zeka geriliği, gelişme geriliği, konuşma gecikmesi-konuşamama, hipotoni, ataksi, epilepsi, otonomik disregülasyon, gibi nörolojik bulgular,
- Sık gülümseme, mutlu hal, stereotipik hareketler, oral davranışlar, uyku bozukluğu,

- HSCP, pilor stenozu ve dirençli kabızlık, gastroözefageal reflü gibi gastrointestinal bulgular,
- Hipospadias ve inmemiş testis gibi genitoüriner bulgular,
- Renal anomalisi olan hastalar,
- Konjenital yapısal kalp hastalığı,
- Korpus kallozum agenezisi, kortikal atrofi, pakigiri, serebellar hipoplazi gibi yapısal santral sinir sistemi anomalileri,
- Boy kısalığı,
- Velofaringeal yetmezlik, yarı damak veya dişlerde maloklüzyon
- Gözde yapısal defektler, kolobom, strabismus veya kırma kusuru (miyopi, astigmatizm)

Çalışmaya dahil edilen hastaların tıbbi öyküleri, özgeçmiş ve soygeçmiş bilgileri araştırma görevlileri tarafından değerlendirilmiş, her hasta için üç nesil içeren aile ağacı çizilmiş, vücut ölçüleri alınmış, gelişim basamakları sorgulanmış, rutin pediatrik muayeneleri ve dismorfik bulguları değerlendirilmiş, alabilen hastalara Stanford- Binet zeka testi uygulanmış, Ek-1 de yer alan klinik değerlendirme formu doğrultusunda bazal radyolojik değerlendirme, konsültasyon ve tetkikleri yapılmış, hastalar takibe alınmıştır.

3.2. YÖNTEM

Bilgilendirilmiş onam vererek çalışmaya dahil edilen hastaların kan örnekleme yapılmış ve örnekler aşağıda anlatıldığı gibi sitogenetik ve moleküler analize tabi tutulmuştur. Çalışma Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından HEK 12/29-14 numara ile onaylanmıştır.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından B.30.2.HAC.0.05.05.01/154 sayı numarası ile desteklenmiştir.

3.2.1. Kan örnekleme

Kan örnekleme, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Genetik Bölümü'nde, poliklinik hemşiresi tarafından yapıldı. Batikon ve alkolle yapılan lokal cilt dezenfeksiyonunun ardından, kromozom analizi için 6 ml lik heparinli tüpe, DNA izolasyonu için 10 ml lik EDTA'lı tüpe ayrı ayrı kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri sitogenetik ve moleküler analiz için, Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Genetik Laboratuvarı'na yönlendirildi. Burada kromozom analizi, DNA izolasyonu ve dizi analizi işlemi aşağıda belirtildiği şekilde çalışıldı.

3.2.2. Kromozom analizi

Kromozom analizi, bölümümüze ait sitogenetik laboratuvarında periferik kandan lenfoblastoid hücre kültürü yöntemi ile *The ACT Cytogenetics Laboratory Manual* esas alınarak gerçekleştirildi. Steril şartlarda sodyum heparinli tüplere alınmış şekilde laboratuvara kabul edilen kan örnekleri, steril olarak her hasta için 10 ml olarak hazırlanmış özel ortamlar (*RPMI-1620+ fetal bovine serum+ L-glutamin+ fitohemaglutinin+ antibiyotik solüsyon*) içerisine 0,5 ml ilave edilerek ekim işlemi gerçekleştirildi. Ekim sonrası tüpler 37 °C'lik inkübatörlerde 72 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda elde edilen hücre kültürleri *harvest* işlemlerine tabi tutuldu. Bu amaçla metafaz aşamasında 8 damla kolsemid eklenerek durdurulan hücre kültürü 37 °C'lik etüve yerleştirildi ve 20 dakika bu etüvde tutuldu. Yirmi dakika sonra etüvden çıkarılan tüpler 2500 rpm de 10 dakika santrifüj edildi.

Santrifüj işleminden sonra tüplerdeki süpernatant atıldı ve vortekste tüplere 37 °C'lik ısıya getirilmiş 10 ml hipotonik solüsyon (KCl) damla damla ilave edilerek hücre zarı ve çekirdek zarının patlaması sağlandı. Daha sonra tüpler yeniden etüve yerleştirildi, 20 dakika etüvde tutulan tüpler yeniden 10 dakika 2500 rpm'de santrifüj edildi tüplerdeki süpernatant atıldı ve çökelti üzerine vortex ile 10 ml fiksatif (3 birim metil alkol-1 birim asetik asit ile karıştırılarak hazırlanır) damla damla eklendi. Bir gece 2-8 °C'de bekletilen tüpler ertesi gün 10 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı ve çökelti üzerine 7 ml daha fiksatif vorteks ile eklendi. Daha sonra bir kez daha santrifüj işleminden geçen tüplerde süpernatant atıldı ve 5 ml fiksatif vorteks ile eklenerek ve son santrifüj işleminde süpernatant atılarak tüpler yayma işlemine hazır hale getirildi. Tüplerin içinde kalan çökelti birkaç damla fiksatif ile vortekslendi. Pipet yardımı ile tüp içerisinden alınan 1-2 damla materyal kuru ve temiz bir lam üzerine damlatma ya da püskürtme yöntemiyle yayıldı ve ortam şartları göz önünde bulundurularak preparatlar kuru ya da nemli bir ortamda kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar daha sonra bir gece 60 °C Pasteur fırını'nda bekletilerek kromozomların ve hücre çekirdeklerinin lama fiksasyonu sağlandı (eskitme işlemi). Bu işlemden sonra lamlar boyama-bantlama işlemi için hazır hale gelmiş oldu. Preparatlar mikroskopta incelenerek yeterli sayıda ve kalitede metafaz plağına sahip olan lamlar bantlama uygulamasına alındı. G-bantlama yöntemi için preparatlar önce protein çözücü çözeltilerde (0,4/10 g/ml *Trypsin*) 6-10 saniye tutulduktan sonra, özel DNA boyalarıyla (*Giemsa*) boyanarak bantlandı. Bantlamanın kalitesi ışık mikroskobu ile kontrol edildikten sonra *ksilen*'den geçirilen preparatlar üzerine birkaç damla *entellan* damlatılarak lamel ile kapatıldı ve analiz için hazır hale getirildi.

Bantlama işlemi tamamlanan ve en az 450-550 bant rezolüsyonuna sahip olan preparatlar ışık mikroskobu altında analizleri *ISCN 2009, An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*'a uygun olarak analiz edildi. Bu analizler sırasında en az 20 metafaz sahası incelendi, en az 3 metafaz sahası analiz edildi. Birden fazla hücre klonu olması durumunda, olası mozaizmi dışlamak için en az 100 metafaz alanı değerlendirildi.

Analizi yapılacak metafaz görüntüsü özel bir görüntüleme sistemi ile bilgisayarlara aktarıldı ve çıkan karyotipler sonuçları *ISCN 2009'* a uygun olarak rapor edildi.

Kromozom analizi ile konvansiyonel metotla gösterilebilecek kadar büyük delesyon ve translokasyonlar dışlandı. Karyotip analizinde anormal bulgusu olan hastalar çalışmanın diğer basamaklarının dışında tutuldu.

3.2.3. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için tuzda çöktürme (amonyum asetat) yöntemi kullanıldı. Öncelikle izolasyon için kullanılacak nükleer lizis tampon, amonyum asetat, proteinaz K ve %10' luk sodyum dodesil sülfat hazırlamak için gereken malzemeler temin edildi. *Amonyum asetat* solüsyonu hazırlamak için 148 gr *amonyum asetat* 50 ml suda ısıyla çözüldükten sonra 200 ml ye tamamlanarak filtre edildi; nükleer lizis tampon hazırlamak için 0,788 gr *Tris HCl*, 11,68 gr *NaCl* ve 0,37 gr *Na-EDTA* bir miktar distile suda eritildikten sonra eriyik pH'ı 8,2 ye ayarlanıp, 500 ml'ye tamamlanarak otoklavlandı; %10'luk *sodyum dodesil sülfat* solüsyonu hazırlamak için 10 gr *sodyum dodesil sülfat* 100 ml suda eritilerek filtre edildi; toz halde bulunan proteinaz K tüpüne (Sigma-100 mg) 10 ml enjeksiyonluk suyun tamamı boşaltılarak vortekslenip karıştırıldı, hazırlanan solüsyon ependorf tüplere bölünerek -20 °C'de donduruldu. İzolasyon işlemi yapılırken erimesi için dondurucudan *proteinaz K* çıkartıldı. Soğutmalı santifüjler çalıştırılarak +4 °C'ye gelmesi sağlandı. DNA eldesi yapılacak örnekler için öncelikle 10 ml'lik EDTA'lı tüplere alınan kan, her bir hasta için 50 ml'lik Falcon tüplerine boşaltıldı. Ayrıca her hasta için 1,5 ml lik ependorf tüpü hazırlanarak üzerine hasta bilgileri yazıldı. Falcon tüpüne boşaltılan 10 ml'lik kan örneği 40 ml otoklavlanmış soğuk distile su ile karıştırılarak 50 ml'ye tamamlandı ve elle kuvvetlice çalkalandı. 1750 rpm'de (500xg) 20 dakika santifüj edildi. Süpernatant lavaboya döküldü ve kalan çökelti tekrar otoklavlanmış distile su ile 45 ml'ye tamamlandı, dipteki pelet hafifçe çalkalanarak çözüldü, ardından

1900 rpm'de (600xg) 20 dakika santifüj edildi. Süpernatant lavaboya döküldü. Her bir tüpteki çökelti üzerine 3 ml *nükleer lizis tampon* eklenerek tüplerin kapakları kapatıldı ve kuvvetlice çalkalandı. Ardından tüplerin kapakları açılarak, her birine 150 µl proteinaz K ve 200 µl %10'luk *sodyum dodesil sülfat solüsyonu* pipetlendi. Tüpler vortekslendi ve 16 saat 37 °C etüvde bekletildi. 16 saat sonunda her bir tüpe 3 ml amonyum asetat eklenerek kuvvetlice çalkalandı. Bu sırada 20 dakika oda ısısında bekletilen ependorf tüplerine 400µl *Tris-EDTA* tamponu pipetlendi, 4000 rpm'de (3000xg) 20 dakika santifüj edildi. Süpernatant *Pastör pipet* ile dipteki pelete dokunmadan başka bir temiz falkon tüpüne alınarak üzerine etil alkol eklendi. Tüpler elde çalkalandı, tüplerin içinde girdap oluşturularak DNA'nın toparlanması sağlandı. Bu işlem ardından görünür hale gelen DNA pipet ucu yardımıyla toplanarak 400 ml *Tris-EDTA* tamponu içeren tüpler içerisine dikkatlice yerleştirildi. DNA örnekleri iyice çözünmesi için bir gece daha etüvde bekletildi, ertesi sabah tüm örnekler kaydedilerek deney gününe kadar saklanmak üzere -20 °C'lik derin dondurucuya kapatıldı.

3.2.4. DNA Dizi analizi

3.2.4.1. DNA Dizi analizi primerlerinin tasarlanması

MWS patogenezinin sorumlu bilinen tek gen olan *ZEB2* geninin 10 ekzonu bulunmaktadır. Bunlardan 2. ile 9. ekzonların tamamı protein dizisinin kodlanmasında görev alırken 10. ekzonun bir kısmı protein dizisinin kodlanmasında bir kısmı ise *ZEB2* mRNA'sının 3' ucunun sentezinde yer almaktadır. Büyük olan 8. ekzonun 5 parçaya bölünerek incelenmesi, 10. ekzonun protein kodlayan kısmının ise 2 parçaya bölünerek incelenmesi tasarlandığı için *ZEB2* geninin 2-10. ekzonlarına yönelik 14 çift primer tasarlanmıştır. Primer dizilerinin tasarımı, *Ensembl* veri tabanında (<http://www.ensembl.org>) bulunan insan referans genomu, *ZEB2* geni, ENST00000303660 isimli transkriptinin dizisi esas alınarak ve internet üzerinden serbest paylaşımlı 'Primer 3' (<http://primer3.wi.mit.edu>) programı

kullanılarak protein kodlamasına katılan 2-10. ekzonları ve ekzonların çevresindeki en az 5 bp uzunluğundaki intron bölgelerini içine alacak şekilde tarafımızdan yapılmıştır. Tasarlanan primerler Tablo 3.1’de yer almaktadır.

Tablo 3.1. *ZEB2* dizileme analizi için kullanılan primerlerin dizileri, PCR ürünlerinin uzunluğu ve erime sıcaklıkları

Ekzon numarası	Tasarlanan dizi (5’>3’)	PCR ürün uzunluğu	Erime sıcaklığı
Ekzon 2 5' primer	ATTGTCGCTGTGTTTGTTG	253bp	60°C
Ekzon 2 3' primer	TCGGTTCCTTTCCCTTTC	253bp	60°C
Ekzon 3 5' primer	TAGGGGTGGCTGATGTTTC	381bp	59°C
Ekzon 3 3' primer	ACAGATTAGTTGAAGATGTGAAGATG	381bp	59°C
Ekzon 4 5' primer	CTTCCTTGTTCTGTGCTTG	227bp	59°C
Ekzon 4 3' primer	TTTCCTTCCCTGCCTCAC	227bp	59°C
Ekzon 5 5' primer	GGCTATGATGGAGATGGACT	482bp	56°C
Ekzon 5 3' primer	TGTTCTTGTTCTTTATTGGATGT	482bp	56°C
Ekzon 6 5' primer	GCCCGCTTCTCTCTCTCTC	321bp	60°C
Ekzon 6 3' primer	TGCCAATCAAAGCAATATCGT	321bp	60°C
Ekzon 7 5' primer	TCCCCAAAGGTTCAAAGAAA	532bp	59°C
Ekzon 7 3' primer	AACACAAATCAGGCACACAGA	532bp	59°C
Ekzon 8-1 5' primer	TTCTTTTGTTTGGTTTCACA	516bp	58°C
Ekzon 8-1 3' primer	GGCTTCCATCCCTACACC	516bp	58°C
Ekzon 8-2 5' primer	TATGAATGGTGGGCTTGGGA	510bp	60°C
Ekzon 8-2 3' primer	AACTGGCATGAAAATGGAGTG	510bp	60°C
Ekzon 8-3 5' primer	TTGCCTCCAGAGCTTGACTAC	471bp	59°C
Ekzon 8-3 3' primer	CGTTGTTCAAACCATTCTTC	471bp	59°C
Ekzon 8-4 5' primer	CCAACTCCGATGAAGTCT	511bp	59°C
Ekzon 8-4 3' primer	GCTTTTGTTTTGTCTTTGTGG	511bp	59°C
Ekzon 8-5 5' primer	CCCACAGTAGTTCATACACTCCAA	543bp	60°C
Ekzon 8-5 3' primer	GCCACCTCTTTTCTTCATAGCA	543bp	60°C
Ekzon 9 5' primer	TGAGGTTCTCCAAATGTCC	443bp	56°C
Ekzon 9 3' primer	TCCAATAAACAGGCAACAA	443bp	60°C
Ekzon 10-1 5' primer	CACCCTGTCATCTTGTCTTTTC	391bp	59°C
Ekzon 10-1 3' primer	CTTCTTTCTCGTGCTCCTTCTC	391bp	60°C
Ekzon 10-2 5' primer	GCAGAGCATTACCCCTCA	468bp	58°C
Ekzon 10-2 3' primer	CTCCGTCTACATCTGTCTTGG	468bp	58°C

Tasarlanan primerlerin dimer veya saç tokası gibi sekonder yapılar oluşturabilme özellikleri, *Integrated DNA Technologies oligoanalyzer* (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer>) programı kullanılarak test edildi ve her bölge için en az sekonder yapı oluşturan primer çiftleri seçildi. Daha sonra seçilen primer çiftlerinin insan genomunda sadece tek bir bölgeyi özgül olarak çoğalttığını, primerlerin bilinen yaygın bir tek nükleotid değişikliğine *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) denk gelmediğini ve özgül olmayan ürün oluşumuna neden olabilecek tekrar dizileri içinde bulunmadığını göstermek için *University of California at Santa Cruz Genome Browser* (UCSC) (<http://genome.ucsc.edu/>) ve aynı genom görüntüleyicinin *In silico PCR* programı kullanıldı.

Tasarlanan 14 primerin herbirinin başarılı bir PCR için yeterli olduğunun gösterilmesi amacı ile bu primerler sağlıklı bireylerden alınmış iki farklı kontrol DNA'sı ile denendi.

3.2.4.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

PCR öncesi hastalar ve ebeveynlerinden izole edilen DNA örneklerinin derişimleri *Nanodrop 2000c* cihazı kullanılarak belirlendi ve DNA'ların derişimleri 50 ng/µl olacak şekilde seyreltildi. PCR için kullanılacak primerler ise liyofilize olarak satın alındı ve son derişimleri 10 pmol/µl olacak şekilde seyreltildi. Her bir PCR için öncelikle Dr. Zeydanlı marka 34,8 µl su, 5 µl 10X tampon çözeltisi, 4 µl 2,5M *dNTP*, 1 µl 25mM *MgCl₂*, 0,2 µl *Taq Polimeraz*, o bölge için tasarlanmış 2 µl 5' primer ve 2 µl 3' primer, son olarak 1 µl ilgili bireyin DNA'sı karıştırıldı. PCR, 95 °C'de 5 dakika ile denatürasyon ile başlanarak, 95 °C'de 30 saniye, ilgili primerin Tablo 3.2'de belirtilen erime sıcaklıklarında 30 saniye, 72 °C'de 30 saniye olacak şekilde 40 döngüde ve son ekstansiyon olarak 72 °C'de 2 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünleri etidyum bromür içeren %2'lik agaroz jelde 120 Volt'ta 25

dakika yürütüldükten sonra *UVP BioSpectrum 500* görüntüleme sisteminde görüntülendi. Uygun uzunlukta tek bant elde edilen PCR ürünleri için bir sonraki aşamaya ilerlenirken tek bant elde edilemeyen veya bantın zayıf olduğu durumlarda reaksiyon koşulları değiştirilerek PCR'ler tekrarlandı ve elektroforezde zayıf olmayan tek bant elde edilmeye çalışıldı. Bunun için yapılan optimizasyon çalışmalarında ekzon 2 için 5 µl *dimetil sülf oksit* (DMSO) eklenmesi ve DNA miktarının 6 µl'ye çıkarılması, ekzon 3 ve ekzon 10-2 için fazladan MgCl₂ eklenmemesi, ekzon 4 için 5 µl *DMSO* eklenmesi elektroforezlerde tek ve güçlü bant elde edilmesini sağlandı.

Ekzon 8-1 ve ekzon 8-2 için ise dizileme için uygun bir elektroforez görüntüsü elde edilemedi. Bu bölgeler için ekzon 7'nin 5'primeri ile ekzon 8-3'ün 3'primeri kullanılarak uzun bir bölgeyi çoğaltmaya yönelik PCR yapıldı. Uzun bölgeyi çoğaltmaya yönelik PCR için *Invitrogen Platinum Taq* ile 35,3 µl su, 5 µl 10X tampon çözeltisi, 4 µl 2,5M *dNTP*, 1,5 µl 25mM *MgCl₂*, 0,2 µl *Taq Polimeraz*, 1 µl 5' primer ve 1 µl 3' primer, son olarak 2 µl ilgili bireyin DNA 'sı karıştırıldı. PCR, 95 °C'de 5 dakika ile denatürasyon ile başlanarak, 95 °C'de 30 saniye, ilk 15 döngü için 62 °C'de ve sonraki dönüler için 60 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 3 dakika olacak şekilde 50 döngüde ve son ekstansiyon olarak 72 °C'de 5 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi. Elektroforezde daha uzun spesifik bantlar da elde edilmesi üzerine bu bölge için PCR pürifikasyonu jelden pürifikasyon şeklinde yapıldı.

3.2.4.3. PCR ürününü saflaştırma

Elektroforezde uygun uzunlukta tek bant elde edilen PCR ürünleri için *Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* ile saflaştırma yapıldı. Bunun için 45 µl PCR ürünü ile 45 µl membran bağlama çözeltisi karıştırılmış ve pürifikasyon kolonlarının üzerine eklemiştir. 14.000g'de 1 dakika santrifüj ile PCR ürünlerinin kolonlara tutunması sağlandı. Ardından, önce 700 µl membran yıkama çözeltisi eklenerek 14.000g'de 1 dakika ve 500 µl membran yıkama çözeltisi eklenerek 14.000g'de 5 dakika santrifüj ile kolona

bağlı olan PCR ürünleri yıkanarak PCR ürünleri safsızlıklardan uzaklaştırıldı. 14.000g'de 1 dakika bir çözelti ekmeden yapılan santrifüj ile membran yıkama çözeltisinin içerisindeki etanol de uzaklaştırıldıktan sonra 40 µl su eklenerek 14.000g'de 1 dakika santrifüj sonrası pürifiye PCR ürünleri elde edildi. Jelden PCR pürifikasyonu için ise PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 120 Volt'ta 45 dakika yürütüldükten UV ışık altında uygun uzunluktaki PCR bandı kesilerek diğer PCR ürünlerinden ayrılmıştır. Kesilen jel 300 µl membran bağlama çözeltisi ile karıştırılarak 62 derecede 10 dakika boyunca jelin çözünmesi sağlandı. Daha sonra pürifikasyon kolonlarının üzerine eklenen bu çözelti ile yukarıda anlatılan uygun uzunlukta tek bant elde edilen PCR ürünleri için uygulanan yöntem kullanılarak pürifiye PCR ürünleri elde edildi.

3.2.4.4. Dizi reaksiyonu

Pürifiye edilmiş PCR ürünlerinin derişimleri *Nanodrop 2000c* cihazı kullanılarak belirlendi ve derişimleri 40 ng/µl olacak şekilde seyreltildi. Sekans reaksiyonu için 12 µl su, 4 µl 5X *BigDye* Sekanslama tampon çözeltisi, 2 µl *BigDye Terminator* v 3.1 Sekanslama çözeltisi, 1 µl o bölge için tasarlandı 5' veya 3' primer ve 1 µl pürifiye PCR ürünü karıştırıldı. Sekans reaksiyonu, 95 °C'de 5 dakika ile denatürasyon ile başlanarak, 95 °C'de 15 saniye, 50 °C'de 15 saniye, 60 °C'de 4 dakika olacak şekilde 25 döngüde ve son ekstansiyon olarak 60 °C'de 7 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi.

3.2.4.5. Dizi pürifikasyonu

Sekans reaksiyonu ürünleri *Zymo Research DNA Sequencing Clean-Up Kit* ile pürifiye edilmiştir. Bunun için 20 µl sekans reaksiyonu ürünü ile 240 µl sekans bağlama çözeltisi karıştırılmış ve pürifikasyon kolonlarının üzerine eklemiştir. 14.000g'de 30 saniye santrifüj ile PCR ürünlerinin kolonlara tutunması sağlanmıştır. Ardından, 300 µl membran yıkama çözeltisi eklenerek 14.000g'de 30 saniye santrifüj ile kolona bağlı olan sekans

reaksiyonu ürünleri yıkanarak sekans reaksiyonu ürünleri safsızlıklardan uzaklaştırılmıştır. 20 µl formamid eklenerek 14.000g'de 30 saniye santrifüj sonrası pürifiye sekans reaksiyonu ürünleri elde edilmiştir.

3.2.4.6. Analiz

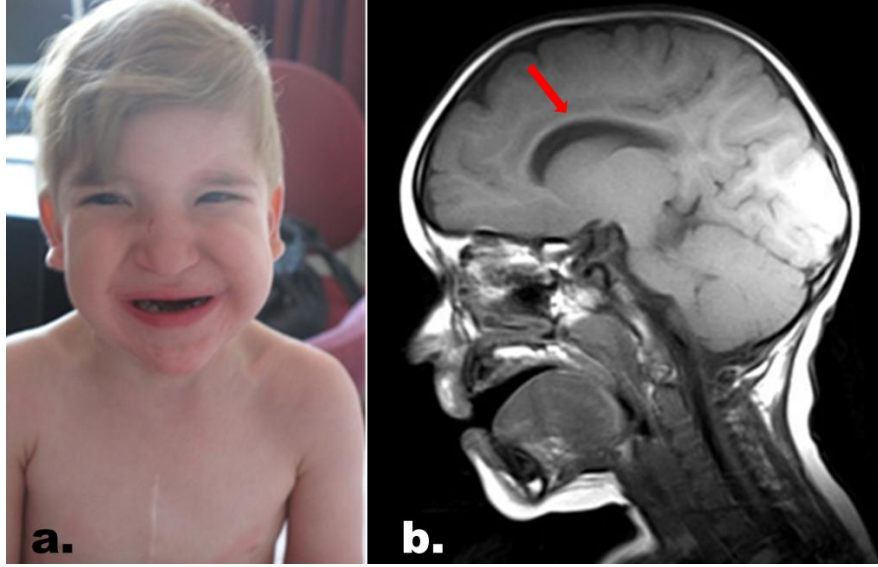
Elde edilen pürifiye sekans reaksiyonu ürünleri 95 °C'de 10 dakika boyunca denatüre edildikten sonra hızlıca buza batırılarak pürifiye sekans ürünlerinin tek zincir halinde elde edilmesi sağlanmıştır. Ardından, pürifiye sekans reaksiyonu ürünlerinin *ABI 3100–Avant Genetic Analyzer* ile kapiller elektroforez yapılarak dizileri saptanmıştır.

3.2.4.7. Verilerin değerlendirilmesi

Yapılan DNA dizi analizi sonuçlarının değerlendirilmesi için *Chromas Lite v2.01* programı kullanılmıştır. Buna göre elde edilen diziler okunarak *ensembl* veri tabanındaki referans dizisi ile karşılaştırılmıştır. Referans dizisinde yer almayan veya daha önceden polimorfizm olarak bildirilmeyen dizi sonuçları daha önceden insanlarda hastalık yapan tüm mutasyonların toplandığı *The Human Gene Mutation Database* (HGMD)'de, (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>) araştırılmıştır. Daha önceden Mowat-Wilson Sendromu'ndan sorumlu olduğu bildirilmiş nükleotid değişiklikleri için analiz sonuçlandırılırken, daha önceden bildirilmemiş değişiklikler için "Mutation Tester" (<http://www.mutationtester.org>) ile değişikliğin türü ve hastalık yapma olasılığı saptanmıştır. Anlamsız "Nonsense" mutasyonlar ve anlamsız mutasyona neden olan çerçeve kayması mutasyonları doğrudan Mowat-Wilson Sendromu ile ilişkili olarak kabul edilmiştir. Mutasyon saptanan bütün bireyler için mutasyonun *de novo* olduğunu kanıtlamak amacıyla ulaşılabilen ebeveynlere ilgili ekzon için DNA dizi analizi yapılmıştır. Klinik verilerin değerlendirilmesi için *SPSS for Windows 20* programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. KLİNİK, SİTOGENETİK VE MOLEKÜLER BULGULARI İLE HASTALAR

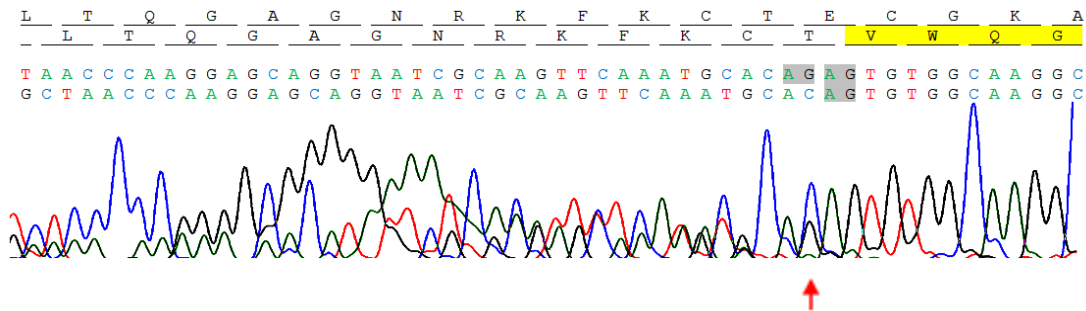


Şekil 4.1. a. Hasta 1, 4 yaş fasyal dismorfik bulguları, b. Kraniyal MRG’de korpus kallozum hipogenezisi.

Hasta 1; 4 yaşında erkek hasta, ilk kez 10 günlükken doktora başvurmuş. Aralarında akrabalık olmayan sağlıklı anne-babanın ilk çocuğu olarak miadında 3400 gr olarak doğmuş. Prenatal ultrasonografi de aort koarktasyonu kaydedilmiş. Postnatal ekokardiyografi de aort koarktasyonu ile beraber atriyal ve ventriküler septal defekti bulunan hasta 20 günlük ve 1 yaşındayken cerrahi geçirmiş. Orta derecede zeka geriliği, motor geriliği ve epilepsisi bulunan hastanın elektroensefalografisinde (EEG) fronto sentro pariyetal epileptik aktivite mevcuttu ve karbamazepin tedavisialıyordu. Kronik kabızlık öyküsü mevcuttu. İşitme testi ve abdomino-renal ultrasonografisi normal olan hastanın muayenesinde mikro-skafosefali, hipertelorizm, medial açılanma gösteren kaşlar, belirgin kolumella, uzun yüz, mutlu yüz ifadesi, açık ağız, hipersalivasyon, yukarı dönük kulak memesi ve hipospadias vardı

(Şekil 4.1.a). Kraniyal MRG'de korpus kallozum hipogenezisi mevcuttu (Şekil 4.1.b). Fizik muayenede ayrıca uylukta hipopigmente lekeler ve dişlerde enamel hipoplazisi kaydedilmişti. Özel eğitim desteği alıyordu. Hastaya bir başka merkezde yapılan tetkiklerden 22q11.2 delesyonu için yapılan FISH analizinde ve *subtelomerik* FISH analizinde delesyon saptanmadığı, kardiyofasiyokutanöz sendrom ön tanısı ile *KRAS*, *BRAF*, *MAP2K1* genlerine dizi analizi yapıldığı herhangi bir mutasyon saptanmadığı öğrenildi. Kromozom analizi; 46,XY olarak saptandı.

ZEB2 gen dizi analizinde ekzon 7'de daha önce literatürde bildirilen c.855_856 delesyon mutasyonu heterozigot olarak saptandı (Şekil 4.1.c) (22). Bu durum protein düzeyinde p. E286Vfs*7 değişikliğine sebep olmaktadır. Bu değişiklik sonucu proteinde mutasyonun olduğu noktadan itibaren bir çerçeve kayması olmakta ve 7 amino asit sonra da protein erken bir şekilde sonlanmaktadır. Bu şekildeki bir mutasyon büyük oranda zarar vericidir. 2 nükleotidlik ardışık olarak 2 kez tekrar edilen bir dizinin tek kopyası silinmiştir. Bir hastalık veri tabanı olan *HGMD*'de (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>) bu mutasyon CD041185 numarası ile yer almaktadır. Bu durum büyük olasılıkla anne veya babada çocuğu oluşturan eşey hücreleri üretilirken DNA polimeraz'ın yaptığı bir kayma *DNA polymerase slippage* hatasına dayanmaktadır. Daha önceden de bu ve benzeri dizi özelliklerinin belli mutasyonlara yatkınlık yaptığı bildirilmiştir (46-48).



Şekil 4.1. c. Hasta 1, *ZEB2* gen dizi analizi sonucu elde edilen elektroferogramda ekzon 7'de iki nükleotidlik ardışık 2 kez tekrar edilen bir dizinin tek kopyasının silindiği ok işareti ile gösteriliyor.

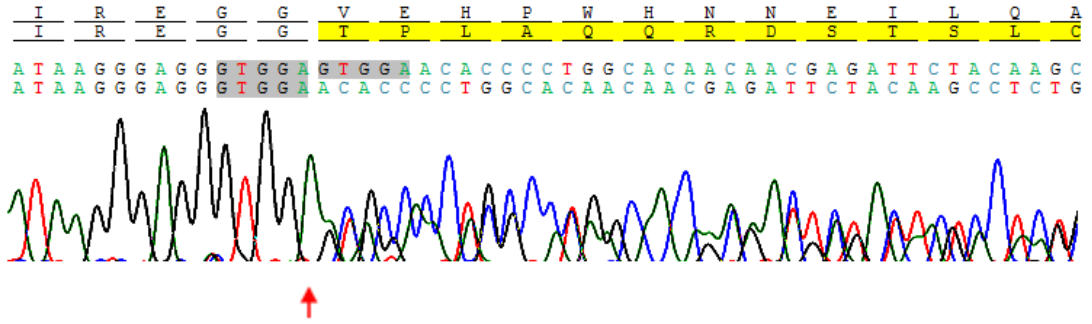
Moleküler analiz sonucunda saptanan değişiklik konusunda aileye bilgi verilmiş, genetik danışma verilmiş, hasta takibe alınmıştır.



Şekil 4.2. a. Hasta 2, 7 yaş fasiyal dismorfik bulguları.

Hasta 2; 11 yaşında kız hasta, ilk kez iki yaşında zeka geriliği ve yürüyememe şikayeti ile doktora başvurmuş. Aralarında akrabalık bulunmayan sağlıklı anne babanın ikinci çocuğu olarak miyadında 3500 gr doğmuş. Prenatal öyküde sorun kaydedilmemiş. Motor gelişim basamakları geri olan hastanın ekokardiyografisinde aort koarktasyonu saptanmış. Üç yaşında nöbet geçirmeye başlayan hastanın eeg'sinde temporopariyetal epileptik aktivite vardı ve okskarbazepin tedavisi alıyordu. Tek kelimelerle konuşabilen, mikrosefalisi ve ağır zeka geriliği bulunan hastanın fizik muayenesinde uzun yüzü, hipertelorizmi, orta hatta açılanma gösteren geniş kaşları, derin yerleşimli iri gözleri, konveks burun profili, belirgin nazal tip ve kolumellasi, sık gülümseyen mutlu ifadesi ve yukarı dönük kulak memesi MWS için tipikti (Şekil 4.2.a). Aralıklı dirençli kabızlık öyküsü veriyordu. Özel eğitim desteği alıyordu. Muayenede ayrıca pes planus ve aksesuar meme başı kaydedilmişti. Kranial MRG'de korpus kallozum agenezisi mevcuttu. Kromozom analizi; 46,XX olarak saptandı.

ZEB2 gen dizi analizinde ekzon 3'de c.277_281 delesyon mutasyonu hastada heterozigot olarak saptanmıştır (Şekil 4.2.b). Bu durumun protein düzeyinde p.V93Tfs*23 değişikliğine neden olduğu tahmin edilmektedir. Bu değişiklik sonucu proteinde mutasyonun olduğu noktadan itibaren bir çerçeve kayması olmakta ve 23 amino asit sonra da protein erken bir şekilde sonlanmaktadır. Bu şekildeki bir mutasyon büyük oranda zarar vericidir. Bu delesyon daha önceden literatürde bildirilmemiştir. Bir polimorfizm veritabanı olan *dbSNP* veritabanında da bildirilmemiştir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). Ancak bu mutasyonun daha sonrasında ekzon 8, ekzon 9 ve ekzon10 da yer alan *nonsens* mutasyonlar dahi Mowat-Wilson Sendromu ile ilişkilendirilmiştir. Bu mutasyonun dikkat çekici olan kısmı 5 nükleotidlik ardışık olarak 2 kez tekrar edilen bir dizinin bir kopyasının silinmesidir. Bu durum büyük olasılıkla anne veya babada çocuğu oluşturan eşey hücreleri üretilirken DNA polimeraz'ın yaptığı bir kayma nedeniyle *DNA polymerase slippage* hatasına dayanmaktadır. Daha önceden de bu ve benzeri dizi özelliklerinin belli mutasyonlara yatkınlık yaptığı bildirilmiştir (46-48).



Şekil 4.2.b. Hasta 2, *ZEB2* gen dizi analizi sonucu elde edilen elektroferogramda ekzon 3'de beş nükleotidlik ardışık 2 kez tekrar edilen bir dizinin tek kopyasının silindiği ok işareti ile gösteriliyor.

Moleküler analiz sonucunda saptanan değişiklik konusunda aileye bilgi verilmiş, genetik danışma verilmiş, hasta takibe alınmıştır.

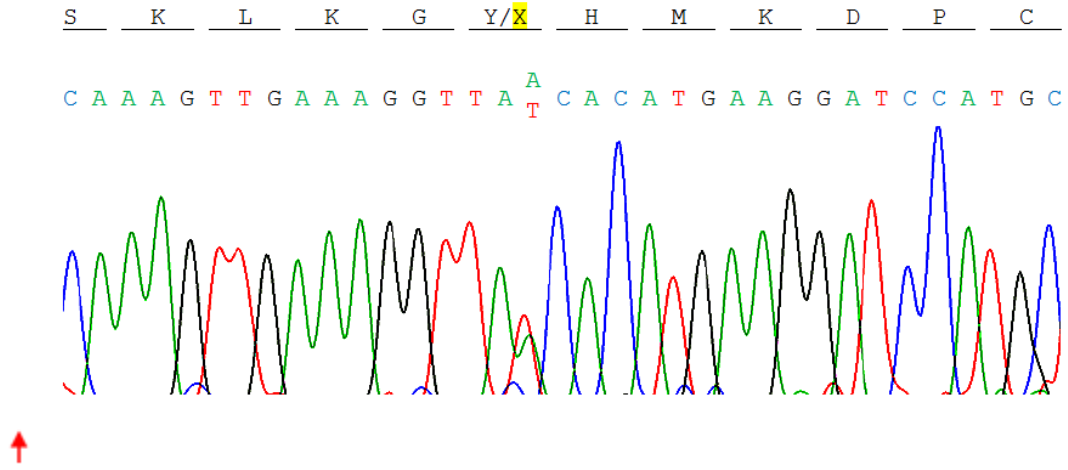


Şekil 4.3.a. Hasta 3, 4 yaş fasiyal dismorfik bulguları.

Hasta 3; 4 yaşında kız hasta, 20 günlükken kabızlık şikayeti ile değerlendirilmiş, 16 aylıkken gelişme geriliği ve dismorfik bulguları olduğu için tekrar doktora başvurmuş. Aralarında akrabalık bulunmayan sağlıklı anne babanın ilk çocuğu olarak miyadında 2700 gr doğmuş. Prenatal öyküde sorun kaydedilmemiş. Hastanın dirençli kabızlık şikayeti 2,5 yaşına kadar devam etmiş. Yedi aylıkken desteksiz oturabilen hasta henüz yürüyememiş, 3 yaşından beri tek kelimelerle konuşabilen ve orta derecede zeka geriliği bulunan hastanın fizik muayenesinde uzun yüzü, hipertelorizmi, mediyal açılanma gösteren geniş kaşları, derin yerleşimli iri gözleri, konveks burun profili, belirgin nazal tip ve kolumellası, sık gülümseyen mutlu yüz-açık ağız ifadesi ve yukarı dönük kulak memesi MWS için tipikti (Şekil 4.3.a). Kraniyal MRG'de yapısal patoloji saptanmadı, ekokardiyografi ve renal ultrasonografi normaldi. Özel eğitim desteği alıyordu. Kas iskelet sistem muayenesinde femoral anteversiyon kaydedilmişti. 15q11.2 Angelman *FISH* analizinde delesyon saptanmadı. Kromozom analizi; 46,XX olarak saptandı.

ZEB2 gen dizi analizinde ekzon 8 de c.1467T>A *nonsens* mutasyonu hastada heterozigot olarak saptanmıştır ve bu durumun protein düzeyinde p.Y921X değişikliğine neden olduğu tahmin edilmektedir (Şekil 4.3.b). Bu

nonsens mutasyon daha önceden literatürde bildirilmemiştir. Bir polimorfizm veritabanı olan *dbSNP* veritabanında da bildirilmemiştir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). Mutasyonun *nonsense* olması ve bu bölgeden sonraki bölgelerde yer alan *nonsens* mutasyonlar ile de MWS'nin ilişkilendirilmesi nedeniyle bu değişikliğin hastalıktan sorumlu olduğu şiddetle düşünülmektedir.



Şekil 4.3.b. Hasta 3, *ZEB2* gen dizi analizi sonucu elde edilen elektroferogramda ekzon 8'de saptanan heterozigot *nonsense* c.1467T>A mutasyonu ok işareti ile gösteriliyor.

Moleküler analiz sonucunda saptanan değişiklik konusunda aileye bilgi verilmiş, genetik danışma verilmiş, hasta takibe alınmıştır.

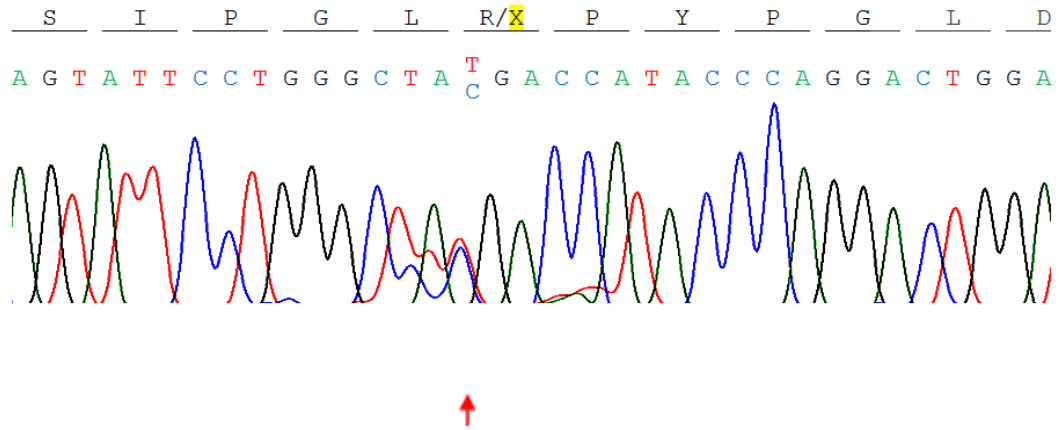


Şekil 4.4.a. Hasta 4, 9 yaş fasiyal dismorfik bulguları.

Hasta 4; 9 yaşında kız hasta, ilk kez 4 yaşında gelişme geriliği ve konuşamama şikayeti ile doktora başvurmuştu. Aralarında birinci derece kuzen evliliği bulunan sağlıklı anne babanın ilk çocuğu olarak miyadında 2900 gr doğmuştu. Prenatal öyküde sorun kaydedilmemişti. 2,5 yaşında yürümeye, 4 yaşından sonra tek kelimelerle konuşmaya başlamıştı. Dört yaşında nöbet geçirmeye başlayan hastanın EEG'sinde frontotemporal keskin dalgalar vardı, valproik asit ve levotirasetam tedavisi alıyordu. Mikrosefali ve ağır zeka geriliği bulunan hastanın fizik muayenesinde uzun yüzü, hipertelorizmi, mediyal açılanma gösteren geniş kaşları, derin yerleşimli iri gözleri, konveks burun profili, belirgin nazal tip ve kolumellasi, sık gülümseyen mutlu ifadesi ve yukarı dönük kulak memesi MWS için tipikti (Şekil 4.4.a). Aralıklı dirençli kabızlık öyküsü veriyordu. Özel eğitim desteği alıyordu. Muayenede ayrıca dişlerde maloklüzyon ve ince uzun parmaklar kaydedilmişti. Kraniyal MRG'de periventriküler lökomalazi dışında yapısal patoloji yoktu. Ekokardiyografi de atriyal septal defekt, balon uygulanmış pulmoner stenoz, trikuspit ve pulmoner kapaklarda hafif yetmezlik

saptanmıştı. Daha önce yapılan tetkiklerden frajil X DNA analizinde normal CGG tekrar sayısı normaldi. Kromozom analizi; 46,XX olarak saptandı.

ZEB2 gen dizi analizinde ekzon 8-5 bölgesinde c.2761C>T mutasyonu heterozigot olarak saptandı (Şekil 4.4.b). Bu mRNA değişikliği erken bir stop kodonu oluşmasıyla sonuçlanmakta ve bu da protein düzeyinde p.R921X değişikliğine neden olarak erken sonlanmış fonksiyon görmeyen bir protein oluşturmaktadır. Bu *nonsense* mutasyonun MWS'den sorumlu olduğu literatürde daha önce bildirilmiştir (6,8).



Şekil 4.4.b. Hasta 4, *ZEB2* gen dizi analizi sonucu elde edilen elektroferogramda ekzon 8-5' de saptanan heterozigot *nonsense* c.2761C>T mutasyon ok işareti ile gösteriliyor.

Moleküler analiz sonucunda saptanan değişiklik konusunda aileye bilgi verilmiş, genetik danışma verilmiş, hasta takibe alınmıştır.

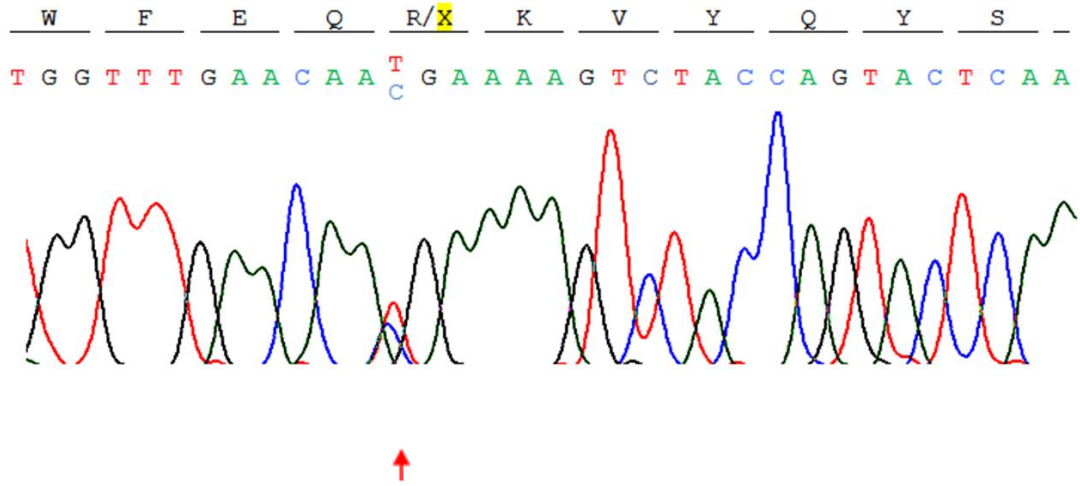


Şekil 4.5.a. Hasta 5, 4 yaş fasiyal dismorfik bulguları.

Hasta 5; Dört yaşında kız hasta, ilk kez 3,5 yaşında gelişme geriliği ve dismorfik bulguları olduğu için doktora başvurmuştu. Aralarında akrabalık bulunmayan sağlıklı anne babanın ilk çocuğu olarak miyadında 3300 gr doğmuştu. Prenatal öyküde sorun kaydedilmemişti. Dokuz aylıkken HSCP için ameliyat olmuştu. 2,5 yaşında yürümeye başlamış ancak hiç konuşamamıştı. Mikrosefalisi ve ağır zeka geriliği bulunan hastanın fizik muayenesinde uzun yüzü, hipertelorizmi, mediyal açılanma gösteren geniş kaşları, derin yerleşimli iri gözleri, konveks burun profili, belirgin nazal tip ve kolumellası, sık gülümseyen mutlu ifadesi ve yukarı dönük kulak memesi MWS için tipikti (Şekil 4.5.a). Muayenede ayrıca ince uzun parmaklar ve sol gözde iris kolobomu kaydedilmişti. Ekokardiyografide patent duktus arteriozus mevcuttu. Özel eğitim desteği alıyordu. Kraniyal MRG'de diffüz serebral atrofiye sekonder lateral ventrikül dilatasyonu dışında yapısal patoloji yoktu. Kromozom analizi; 46,XX olarak saptandı.

ZEB2 gen dizi analizinde ekzon 8' de c.2083C>T nonsens mutasyonu hastada heterozigot olarak saptanmıştır (Şekil 4.5.b) ve bu durumun protein düzeyinde p.R695X değişikliğine neden olduğu tahmin edilmektedir.

Mutasyon proteinin erken sonlanmasına neden olduğu için zarar vericidir. Bir polimorfizm veritabanı olan *dbSNP* veritabanında da rs137852981 numarası ile patojenik bir mutasyon olarak yer almaktadır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). Bu *nonsense* mutasyonun MWS'den sorumlu olduğu literatürde daha önce bildirilmiştir (8,10,13,22,49). Literatürde p.R695X en sık tekrar eden mutasyon olarak bilinir.



Şekil 4.5.b. Hasta 5, *ZEB2* gen dizi analizi sonucu elde edilen elektroferogramda ekzon 8 de saptanan heterozigot *nonsense* c.2083C>T mutasyonu ok işareti ile gösteriliyor.

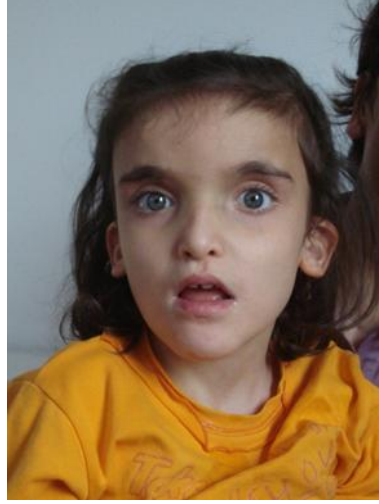
Moleküler analiz sonucunda saptanan değişiklik konusunda aileye bilgi verilmiş, genetik danışma verilmiş, hasta takibe alınmıştır.



Şekil 4.6. Hasta 6, 6 yaş fasiyal dismorfik bulguları.

Hasta 6; 6 yaşında kız hasta, ilk kez 3,5 yaşında konuşamama şikayeti ile doktora başvurmuştu. Aralarında akrabalık bulunmayan sağlıklı anne babanın üçüncü çocuğu olarak miyadında 3000 gr doğmuştu. Prenatal öyküde sorun kaydedilmedi. 2 yaşında yürümeye başlayan hasta 6 yaşında tek kelimeler halinde konuşmaya başlamıştı. Mikrosefali ve orta derecede zeka geriliği bulunan hastanın fizik muayenesinde uzun yüzü, hipertelorizmi, mediyal açılanma gösteren geniş kaşları, derin yerleşimli iri gözleri, konveks burun profili, belirgin nazal tip ve kolumellası, sık gülümseyen mutlu yüz-açık ağız ifadesi ve yukarı dönük kulak memesi MWS için tipikti (Şekil 4.6). Aralıklı dirençli kabızlık öyküsü mevcuttu. Özel eğitim desteği alıyordu. Muayenede ayrıca ince uzun parmaklar, dişlerde maloklüzyon, sol uylukta *café-au-lait* lekesi ve pes planus kaydedilmişti. Ekokardiyografide atriyal septal defekt mevcuttu. Kraniyal MRG'da korpus kallozum spleniyum kesimi incelmışti. Kromozom analizi; 46,XX olarak saptandı.

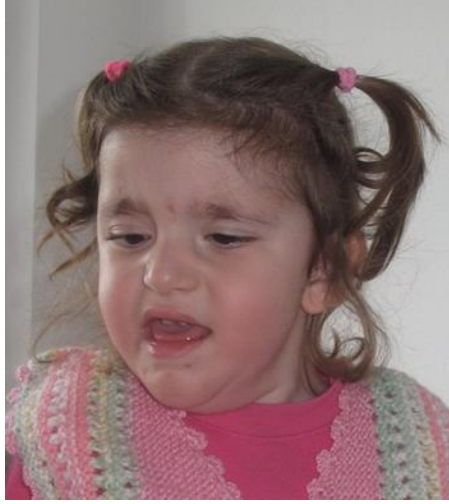
ZEB2 geninin tüm ekzonlarına yapılan dizi analizinde hastalıktan sorumlu olabilecek herhangi bir değişiklik saptanmadı. Moleküler analiz sonucu hakkında aileye bilgi verildi, hasta takibe alındı.



Şekil 4.7. Hasta 7, 8 yaş fasiyal dismorfik bulguları.

Hasta 7; 11 yaşında kız hasta, ilk kez 3 aylıkken anneyi takip etmeme şikayeti ile doktora başvurmuş. Aralarında akrabalık bulunmayan sağlıklı anne babanın ikinci çocuğu olarak miyadında 3200 gr doğmuş. Prenatal öyküde sorun kaydedilmemiş. 4 yaşında yürümeye başlayan hasta hiç konuşamamış. Mikrosefali ve orta derecede zeka geriliği bulunan hastanın fizik muayenesinde uzun yüzü, hipertelorizmi, mediyal açılanma gösteren geniş kaşları, derin yerleşimli iri gözleri, konveks burun profili, belirgin nazal tip ve kolumellası, sık gülümseyen mutlu yüz-açık ağız ifadesi ve yukarı dönük kulak memesi MWS için tipikti (Şekil 4.7). Bir yaşından itibaren nöbet geçirmeye başlamıştı, EEG de düzensiz yüksek amplitüdümlü yavaş dalgaları mevcuttu, valproik asit ve levatirasetam tedavisi alıyordu. Özel eğitim desteği alıyordu. Aralıklı dirençli kabızlık öyküsü vardı. Muayenede ayrıca dişlerde maloklüzyon mevcuttu. Göz muayenesinde sağ optik sinirde incelme ve retinada hipopigmentasyon mevcuttu. Hashimoto tiroiditi sebebiyle tedavi alıyordu. Kraniyal MRG' de herhangi bir yapısal patoloji mevcut değildi. Kromozom analizi; 46,XX olarak saptandı.

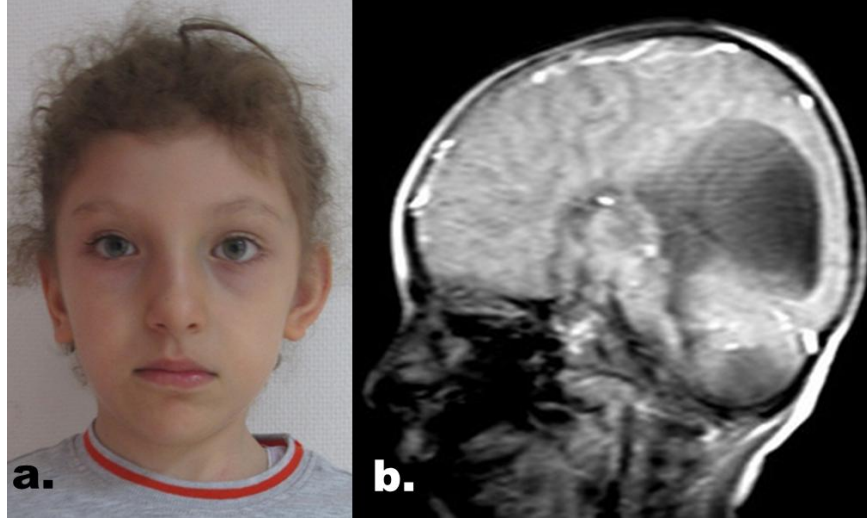
ZEB2 geninin tüm ekzonlarına yapılan dizi analizinde hastalıktan sorumlu olabilecek herhangi bir değişiklik saptanmadı. Moleküler analiz sonucu hakkında aileye bilgi verildi, hasta takibe alındı.



Şekil 4.8. Hasta 8, 2,5 yaş fasiyal dismorfik bulguları.

Hasta 8; 2,5 yaşında kız hasta, gelişme geriliği ve dismorfik bulgular ile doktora başvurmuştu. Aralarında akrabalık bulunmayan sağlıklı anne babanın ikinci çocuğu olarak miyadında 2800 gr doğmuştu. Prenatal öyküde sorun kaydedilmemişti. 10 günlükken HSCP için ameliyat olmuştu. 28 aylıkken yürümeye başlayan hasta henüz konuşamamıştı. Mikrosefalisi ve gelişme geriliği bulunan hastanın fizik muayenesinde hipertelorizmi, mediyal açılanma gösteren geniş kaşları, belirgin nazal tip ve kolumellasi, MWS için tipikti (Şekil 4.8). Aralıklı kabızlık öyküsü mevcuttu. Özel eğitim desteği alıyordu. Muayenede ayrıca strabismus ve ciltte hiper-hipopigmente lekeler kaydedilmişti. Ekokardiyografide patent foramen ovale mevcuttu. Kraniyal MRG'de herhangi bir yapısal patoloji mevcut değildi. Kromozom analizi; 46, XX olarak saptandı.

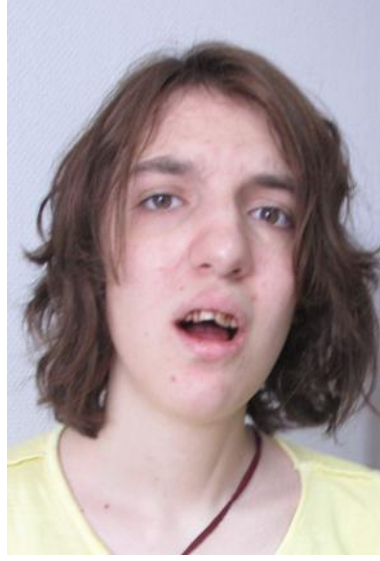
ZEB2 geninin tüm ekzonlarına yapılan dizi analizinde hastalıktan sorumlu olabilecek herhangi bir değişiklik saptanmadı. Moleküler analiz sonucu hakkında aileye bilgi verildi, hasta takibe alındı.



Şekil 4.9. a. Hasta 9, 7 yaş fasiyal dismorfik bulguları, b. Kraniyal MRG'de korpus kallozum agenezisi ve ventriküllerde kolposefalik genişleme.

Hasta 9; 7 yaşında kız hasta, ilk kez 15 aylıkken gelişme geriliği ve dismorfik bulgular ile doktora başvurmuştu. Aralarında akrabalık bulunmayan sağlıklı anne babanın ikinci çocuğu olarak miyadında 2800 gr doğmuştu. Prenatal öyküde sorun kaydedilmemişti. Yirmi aylıkken yürümeye başlayan hasta 3 yaşından sonra tek kelimelerle konuşmuş, halen yarı anlaşılır cümleler kurabiliyordu. Mikrosefalisi ve hafif zeka geriliği bulunan hastanın fizik muayenesinde uzun yüzü, hafif hipertelorizmi ve mediyal açılanma gösteren kaşları mevcuttu (Şekil 4.9). Odiyolojik incelemede sağ kulakta sensörinöral işitme kaybı tespit edilmişti. Muayenede ayrıca dişlerde maloklüzyon ve bilateral inguinal herni operasyon skarı kaydedilmişti. Ekokardiyografide 2.derece triküspit yetmezlik mevcuttu. Kraniyal MRG'de korpus kallozum agenezisi ve lateral ventriküllerde kolposefalik genişleme vardı. Özel eğitim desteği alıyordu. Daha önce yapılan tetkiklerden subtelomerik FISH analizinde patolojik değişiklik yoktu. Kromozom analizi; Normal 46, XX olarak saptandı.

ZEB2 geninin tüm ekzonlarına yapılan dizi analizinde hastalıktan sorumlu olabilecek herhangi bir değişiklik saptanmadı. Moleküler analiz sonucu hakkında aileye bilgi verildi, hasta takibe alındı.



Şekil 4.10. Hasta 10, 18 yaş fasiyal dismorfik bulguları.

Hasta 10; 18 yaşında kız hasta, ilk kez 13 yaşında geriliği ve dismorfik bulgular ile doktora başvurmuş. Aralarında birinci derece kuzen evliliği bulunan sağlıklı anne babanın üçüncü çocuğu olarak miyadında normal kiloda (kaydedilmemiş) doğmuş. Prenatal öyküde sorun kaydedilmemiş. Üç yaşından sonra yürümüş ve tek kelimelerle konuşmuş, halen cümle kuramıyor. Mikrocefali ve ağır zeka geriliği bulunan hastanın fizik muayenesinde uzun yüzü, sık gülümseyen mutlu yüz-açık ağız ifadesi, hipertelorizmi, mediyal açılanma gösteren kaşları, derin yerleşimli gözleri, konveks burun profili, belirgin nazal tip ve kolumellası mevcuttu (Şekil 4.10). Muayenede ayrıca dişlerde maloklüzyon kaydedilmişti. Ekokardiyografik incelemesi normaldi. İki yıldır özel eğitim rehabilitasyon desteği almıyordu. Kraniyal MRG'de korpus kallozumda incleme mevcuttu. Daha önce yapılan tetkiklerden, kromozom analizi, 46,XX olarak saptandı, 15q11.2 Angelman FISH ve 17p11.2 Smith-Magenis FISH analizinde delesyon saptanmadı, frajil X DNA analizinde normal CGG tekrar sayısı normaldi, subtelomerik FISH analizinde patolojik değişiklik yoktu.

ZEB2 geninin tüm ekzonlarına yapılan dizi analizinde hastalıktan sorumlu olabilecek herhangi bir değişiklik saptanmadı. Moleküler analiz sonucu hakkında aileye bilgi verildi, hasta takibe alındı.

4.2. KLİNİK VE MOLEKÜLER BULGULARIN GENEL DEĞERLENDİRMESİ

Bu çalışma Nisan 2012- Nisan 2013 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Çocuk Genetik Bölümünde'nde gerçekleştirildi. Çalışmaya zihinsel yetersizlik ve dismorfik bulguları olup, eşlik eden klinik özellikleri nedeniyle MWS tanısı düşünülen hastalardan ebeveyni çalışmaya katılmaya onay veren 10 hasta çalışmaya dahil edildi.

Çalışmaya dahil edilen 10 hastanın cinsiyetleri 1'i erkek (%10), 9'u kız (%90) şeklindeydi. Hastaların doktora ilk başvuru yaşı median 2,2 yaş (10/365 gün-13 yaş); median klinik tanı yaşları 3,7 yaş (1,5yaş-15yaş) ve median son kontrol yaşları 6,5 yaş (2,5yaş-18yaş) olarak kaydedildi. İlk kontrol ile tanı arasında geçen süre median 1 yıl (0-7,7 yıl) olarak saptandı. (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Hastaların başvuru, tanı ve son kontrol yaşları.

	Median (ortanca) yaş	Minimum	Maksimum
İlk başvuru yaşı	2,2 yaş	10/365 gün	13 yaş
Klinik tanı yaşı	3,7 yaş	1,5 yaş	15 yaş
Son kontrol yaşı	6,5 yaş	2,5 yaş	18 yaş

On hastanın hiçbirinde prenatal-perinatal problem, hipoksik doğum öyküsü mevcut değildi. Hastaların median doğum ağırlıkları 3200 gr (2700gr-3500gr) şeklindeydi. Doğumda mikrosefalisi olduğu bilinen bir hasta haricinde (hasta 1) doğum boy ve baş çevreleri tıbbi kayıtlara geçmemişti ve aileler tarafından hatırlanmıyordu.

İki hastanın (hasta 4 ve hasta 10) anne babası arasında akrabalık mevcuttu 2/10 (%20). Hiçbir hastanın ailesinde benzer hastalık öyküsü mevcut değildi.

10 hastanın 9' u Stanford-Binet zeka testi ile *intelligence quotient* (IQ) açısından değerlendirildi. Dört hastanın ağır derecede zeka geriliği (IQ: 20-25), 4 hastanın orta derecede zeka geriliği (IQ:40-50), bir hastanın (hasta 9) hafif derecede zeka geriliği (IQ: 69) mevcutken, 2,5 yaşında olduğu için Denver gelişimsel tarama testi II uygulanan bir hastanın (hasta 8) 11 ayla uyumlu global gelişim geriliği mevcuttu (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Hastaların zeka-gelişim düzeyi.

	Global gelişme geriliği	Hafif zeka geriliği (IQ:50-75)	Orta dereceli zeka geriliği (IQ:25-50)	Ağır zeka geriliği (IQ<25)
Hasta sayısı	1	1	4	4
Toplam yüzde	%10	%10	%40	%40

Biri (hasta 9) hariç hastaların tamamında motor gelişim basamakları geri idi, motor gerilik 9/10 (%90). Hastaların median desteksiz oturabildiği ay, 9 ay (6 ay-30 ay); yürüme ayı 45 ay (20ay-132 ay) şeklindeydi.

Üç hastanın (hasta 5, hasta 7 ve hasta 8) hiç konuşma yeteneği yoktu. Diğer 7 hasta, median 3 yaşta (2 yaş- 9 yaş) tek kelimeler halinde konuşmaya başlamıştı. Yarı anlaşılır cümleler kurabilen bir hasta (hasta 9) haricinde diğer hastaların hiç biri son kontrol yaşlarında cümle kuramıyordu, sınırlı kelime kapasitesi ile ancak tek kelimeler halinde konuşabiliyordu.

Sekiz hastanın mikrosefalisi mevcuttu 8/10 (%80). İki ayrı dismorfolog tarafından 8 hastanın yüz bulguları tamamen (%80), 2 hastanın

yüz bulguları ise kısmen (%20), MWS ile uyumlu bulundu. Hastaların ayrıntılı fasiyal dismorfik bulguları Tablo 4.3'de verilmiştir.

Tablo 4.3. Hastaların fasiyal dismorfik bulgularının genel değerlendirmesi.

Bulgular	Hasta 1	Hasta 2	Hasta 3	Hasta 4	Hasta 5	Hasta 6	Hasta 7	Hasta 8	Hasta 9	Hasta 10	Toplam (%)
Uzun yüz	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	90
Hipertelorizm	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	90
Kaşlarda mediyal açılanma	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	80
Derin yerleşimli iri gözler	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	70
Konveks burun profili	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	80
Belirgin nazal tip	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	90
Belirgin kolumella	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	90
Yukarı dönük kulak memesi	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	70
Mutlu yüz ifadesi	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	80
Açık ağız ifadesi	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	70
Açık renkli göz	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	40
İriste heterokromi	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	20
Tipik yüz değerlendirmesi	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	80

Altı hastada epileptik nöbet tarif ediliyordu (%60), median nöbet başlangıç yaşı, 2,5 yaş (1yaş- 10yaş) şeklindeydi. Nöbet öyküsü bulunan 6 hastanın 4'ü (%66) halen antiepileptik ilaç kullanıyordu. Yine nöbet öyküsü bulunan 6 hastanın 2'sinde (%33) nöbetler iki veya daha fazla antiepileptik ilacın kombine kullanımı ile kontrol altına alınabilen tedaviye dirençli nöbetlerdi (Tablo 4.4). Nöbet geçiren 6 hastanın 4'ünde (%66) epileptik bulgular elektroensefalografide gösterilmişti.

Tablo 4.4. Nöbet geçiren hastaların tedavi özellikleri.

	Nöbet (+)			Nöbet (-)
	Tekli tedavi	Çoklu tedavi	Tedavisiz izlem	
Hasta sayısı	2	2	2	4
Toplam %	%20	%20	%20	%40

Hastaların hiçbirisi disotonomik bulgu tarif etmiyordu. Bir hasta (hasta 10) hariç hastaların hiçbirinde stereotipik hareketler (%10) kaydedilmemişti. Beş hastada (%50) kraniyal MRG'de korpus kallozum aplazisi veya hipoplazisi kaydedilmişti. Kaydedilen diğer kraniyal MRG bulguları, 2 hastada (hasta 5, hasta 9) lateral ventriküllerde dilatasyon (%20), bir hastada (hasta 4) periventriküler lökomalazi (%10) ve bir hastada (hasta 1) (%10) serebral mikrohemoraji şeklindeydi. Üç vakada kraniyal MRG tamamen normal olarak rapor edilmişti.

Uyku bozukluğu hiçbir hastada tarif edilmiyordu. Sürekli bir şeyler ısırma, kemirme, yiyecek olmayan şeyleri ağzına götürme, tırnak yeme gibi oral davranışlar 7 hastada (%70) tarif ediliyordu.

Hastaların tamamı (%100) aileleri tarafından mutlu bir çocuk olarak tanımlanmıştı. Sekiz hastada (%80) sık gülümseyen mutlu yüz ifadesi muayene sırasında da gözlenmişti.

İki hasta hariç hastaların tamamının baş çevresi -2 standart deviasyonun altında ölçüldü (<-2SD), yani hastaların %80'i mikrosefalikti. Hastaların ağırlık ve boy persentil değerlerinin dağılımı Tablo 4.5'de verilmiştir. Hiçbir hastada boy kısalığı tespit edilmemiştir.

Tablo 4.5. Hastaların ağırlık ve boy persentil değerlerinin dağılımı.

	Değerleri belirtilen aralıkta olan hasta sayısı						
	<3 p	3-10 p	10-25 p	25-50p	50-75 p	75-90 p	>90p
Vücut ağırlığı	1	3	3	1	2	–	–
Boy	–	2	3	4	1	–	–

Yedi hastada (%70) ekokardiyografi ile doğumsal kalp hastalığı saptandı, 3 hastada (%30) hiçbir kardiyak anomali saptanmadı. Bir hastaya cerrahi tedavi ile beraber balon anjiyoplasti, 2 hastaya sadece balon anjiyoplasti ile tedavi uygulandı. Saptanan anomali ve tedavi-izlem şekli Tablo 4.6'da belirtilmiştir.

Tablo 4.6. Saptanan kardiyak anomali ve tedavi-izlem şekli.

Hasta	Saptanan doğumsal kalp hastalığı	Tedavi-izlem
Hasta 1	AK, ASD, VSD, PDA	Cerrahi, balon anjiyoplasti (AK), tıbbi tedavi ile izlem
Hasta 2	AK	Balon anjiyoplasti (AK)
Hasta 4	ASD, PS, TY, PY	Balon anjiyoplasti (PS)
Hasta 5	PDA	Klinik takip ile izlem
Hasta 6	ASD	Klinik takip ile izlem
Hasta 8	2° TY	Klinik takip ile izlem
Hasta 9	PFO	Klinik takip ile izlem

Aort koarktasyonu (AK); Patent duktus arteriyozus (PDA); atriyal septal defekt (ASD); ventriküler septal defekt (VSD); patent foramen ovale (PFO); triküspit yetmezlik (TY); pulmoner stenoz (PS); pulmoner yetmezlik (PY)

Yedi hastada (%70) dirençli kabızlık öyküsü mevcuttu. 2 hastanın, (hasta 5), 9 aylıkken, (hasta 8), 10 günlükken HSCP için cerrahi geçirme öyküsü vardı (%20). Cerrahi geçiren hastaların operasyon sonrası kabızlık şikayetleri düzelmişti. Sadece bir hasta (hasta 9), hayatının hiç bir döneminde dirençli kabızlık sorunu çekmemişti (%10) (Tablo 4.7). Hastalardan hiçbirinde pilor stenozu olmamıştı.

Tablo 4.7. İntestinal bulgular.

	HSCP	Dirençli kabızlık	Normal dışkılama
Hasta sayısı	2	7	1
Toplam %	%20	%70	%10

HSCP: Hirschsprung hastalığı

Göz muayenesinde, iki hastada kırma kusuru (+1° astigmatizm), bir hastada strabismus, bir hastada sol gözde iris kolobomu, bir hastada sağ optik sinirde incelme ile beraber retinada hipopigmentasyon tespit edildi (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Göz bulguları.

Bulgular	Kırma kusuru	Strabismus	İris kolobomu	Optik sinirde incelme, retinal hipopigmentasyon	Normal göz muayenesi
Hasta sayısı	2	1	1	1	5
Toplam %	%20	%10	%10	%10	%50

Hiçbir hastada yarı dudak-damak anomalisi mevcut değildi.

Sadece bir hastada saptanan (hasta 9) tek taraflı sensori-nöral işitme kaybı (%10) dışında tüm hastaların işitme testi normaldi.

İki hastada saptanan pes planus (%20), bir hastada saptanan femoral anteversiyon (%10) dışında başka bir patolojik kas-iskelet sistemi muayene bulgusu bulunmuyordu. Üç hastada (%30) muayenede ince uzun parmaklar olduğu kaydedilmişti.

Fizik muayenede 2 hastada ciltte hipopigmente lekeler (%10), bir hastada uylukta 6x5 cm *café-au-lait* (%10) lekesi dışında anormal bir cilt muayene bulgusu yoktu.

Tek erkek hasta olan hasta 1'de hipospadias mevcuttu, ancak inmemiş testis yoktu. Diğer 9 kız hastada herhangi bir genitoüriner anomali saptanmadı. Hiçbir hastada ultrasonografi ile renal anomali saptanmadı.

Beş hastada (%50) dişlerde maloklüzyon, bir hastada enamel hipoplazisi (hasta 1) (%10) kaydedildi.

Fizik muayenede kaydedilen diğer bulgular; hasta 1'de sagittal sütürde kraniyosinostoz ile beraber skafosefali, hasta 2'de aksesuar meme başı, hasta 7'de Hashimoto tiroiditine bağlı hipotiroidi, ve hasta 9'da ameliyat edilmiş bilateral inguinal herni idi.

Hastaların tamamının kromozom analizleri normaldi. Hiçbir hastada sitogenetik olarak gözlenebilen yapısal sayısal değişiklik, delesyon-duplikasyon saptanmamıştı.

On hastanın 5'inde (%50) MWS etyolojisinden sorumlu olduğu düşünülen moleküler genetik değişiklik dizi analizi ile saptandı. Saptanan bu değişikliklerin 2'si çerçeve kayması, *frameshift*, 3'ü erken stop kodon oluşumuna, *nonsense*, dolayısıyla protein sentezinin erken sonlanmasına, immatür normal fonksiyonunu gösteremeyen protein ürünü oluşumuna sebep olan, *truncating* mutasyonlardı. Bu mutasyonların 3'ü literatürde daha önce bildirilmiş, 2'si daha önce bildirilmemiş yeni mutasyonlardı.

Bu bilgiler ışığında, tüm vakaların (5/10) %50'sinde, tipik yüz bulguları olan vakaların (5/8) %62'sinde dizi analizi ile hastalık etyolojisinden sorumlu

moleküler genetik değişiklik saptandı. Saptanan değişiklikler (2/5) %40 *frameshift*, (3/5) %60 *nonsense* mutasyon şeklindeydi. Literatürde daha önce bildirilmeyen iki yeni mutasyon tanımlanmıştır. Hastaların moleküler ve sitogenetik bulguları Tablo 4.9'da özetlenmiştir.

Mutasyon saptanan ve saptanmayan grupta bulgularda gözlenen değişkenlik Tablo 4.10'da incelenmiştir. Hasta sayısının az olması sebebiyle gruplar arasında istatistiksel değerlendirme yapılamamış bu yüzden herhangi bir genotip-fenotip ilişkisi kanıtlamak mümkün olmamıştır. Mutasyon saptanan hastaların klinik bulguları Tablo 4.11'de literatürle karşılaştırılmıştır. Tablo 4.12'de hastaların klinik ve moleküler bulguları toplu halde verilmiştir.

Tablo 4.9. Hastaların moleküler ve sitogenetik bulguları.

	Daha önce yapılmış olan ve normal çıkan diğer testler	Kromozom analizi	Dizi analizi ile saptanan mutasyon	Protein değişikliği	Mutasyon tipi
Hasta 1	22q11.2 FISH Subtelomerik FISH <i>KRAS, BRAF, MAP2K1</i> dizi anal.	46,XY	Ekzon 7 c.855_856	p.E286Vfs*7	<i>Frameshift</i> (tanımlı) [#]
Hasta 2	–	46,XX	Ekzon 3 c.277_281	p.V93Tfs*23	<i>Frameshift</i> (yeni)
Hasta 3	15q11.2 FISH	46,XX	Ekzon 8 c.1467 T>A	p.Y489X	<i>Nonsense</i> (yeni)
Hasta 4	FragilX DNA anal.	46,XX	Ekzon 8 c.2761 C>T	p.Arg921X	<i>Nonsense</i> (tanımlı) ^{##}
Hasta 5	–	46,XX	Ekzon 8 c.2083 C>T	p.Arg695X	<i>Nonsense</i> (tanımlı) ^{###}
Hasta 6	–	46,XX	–	–	–
Hasta 7	–	46,XX	–	–	–
Hasta 8	15q11.2 FISH	46,XX	–	–	–
Hasta 9	Subtelomerik FISH Array CGH	46,XX	–	–	–
Hasta 10	15q11.2 FISH FragilX DNA anal. Subtelomerik FISH 17p11.2 FISH	46,XX	–	–	–
Toplam			5 (%50)		3 <i>nonsense</i> (%60) 2 <i>frameshift</i> (%40)

[#](22) , ^{##}(6,8) , ^{###}(8,10,13,22,49)

Tablo 4.10. Bulguların görülme sıklığına göre mutasyon saptanan (+) ve saptanmayan (-) hastaların karşılaştırılması.

Bulgu	Mutasyon (+) hastalarda görülme sıklığı*	Mutasyon (-) hastalarda görülme sıklığı*
Tipik yüz	(5/5) %100	(3/5) %60
Ağır zeka geriliği	(3/5) %60	(1/5) %20
Mikrosefali	(5/5) %100	(3/5) %60
Korpus kallozum agenezi-hipogenezisi	(2/5) %40	(3/5) %60
Nöbet	(3/5) %60	(2/5) %40
Mutlu hal	(5/5) %100	(4/5) %80
HSCP	(1/5) %20	(1/5) %20
Dirençli kabızlık	(4/5) %80	(3/5) %60
Motor gerilik	(5/5) %100	(4/5) %80
Konuşma gecikmesi-konuşamama	(5/5) %100	(5/5) %100
Konjenital kalp hastalığı	(4/5) %80	(3/5) %60
Ürogenital renal anomali	(1/5) %20	(0/5) %0
Yapısal göz anomali	(1/5) %20	(1/5) %20
Dişlerde maloklüzyon	(1/5) %20	(4/5) %80
İşitme kaybı	(0/5) %0	(1/5) %20
Ciltte hiper-hipo pigmente leke	(1/5) %20	(2/5) %40
Kas iskelet sistemi bulgusu	(2/5) %40	(1/5) %20

*Mutasyon (+) ve negatif (-) saptanan gruplar için yüzdeler ayrı ayrı verilmiştir.

Tablo 4. 11. Mutasyon (+) saptanan hastaların klinik bulgularının literatürle karşılaştırılması.

Klinik özellik	Mevcut çalışma	Yayınlanmış total vaka (Garavelli et al) (9)
Tipik yüz bulguları	(5/5) %100	(184/188) %98
Erkek: Kız hasta oranı	1/4	106:85
Zeka geriliği	(5/5) %100 2 orta, 3 ağır derece	%100
Mikrosefali	(5/5) %100	(145/180) %80
Nöbet	(3/5) %60	(116/157) %74
HSCP	(1/5) %20	(102/187) %54
Kronik-dirençli kabızlık	(4/5) %80	(25/83) %30
Konjenital kalp hastalığı	(4/5) %80	(100/185) %54
Renal anomali	(0/5) %0	(21/166) %13
Hipospadias	(1/5) %20	(38/68) %56
İnmemiş testis	(0/5) %0	(25/68) %37
Kısa boy	(0/5) %0	(43/85) %50
Korpus kallozum agenezi veya hipogenezisi	(2/5) %40	(77/167) %46
Yapısal göz anomalisi	(1/5) %20	(7/181) %4
Pilor stenozu	(0/5) %0	(9/181) %5
Yarık Damak	(0/5) %0	(5/181) %3
ZEB2 mutasyonu	(5/5) %100	%100

Tablo 4.12. Hastaların klinik özellikleri ve bulguları.

Hasta no	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
İsim	Ö.Ç.P.	M.G.	S.Ö.	S.T.	Z.Z.	S.K.	D.E	E.S.	A.N.İ.	R.İ.
Hacettepe no.	3645515	3016875	3028725	2827556	2692612	3034576	2478977	3643196	2814754	2821557
Genetik no.	59.702	52.024	56.345	47.513	43.503	54.708	35.270	59.064	45.513	45.740
Cinsiyet	E	K	K	K	K	K	K	K	K	K
Yaş	4	11	4	9	4	6	11	2,5	7	18
Zihinsel yetersizlik	Orta derece	Ağır derece	Orta derece	Ağır derece	Ağır derece	Orta derece	Orta derece	Gelişme geriliği	Hafif derece	Ağır derece
Mikrosefali	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
Tipik yüz	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Nöbet	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
HSCP	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Kabızlık	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Motor gerilik	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Konjenital kalp hastalığı	AK,ASD,VS D,PDA	AK	-	ASD,PS, TY,PY	PDA	ASD	-	TY	PFO	-
Renal anomali	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipospadias	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Korpus kallozum aplazi/hipoplazisi	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
Dişlerde maloklüzyon	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
Mutlu hal	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Oral davranışlar	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Kısa boy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Yapısal göz anomalisi	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
İşitme kaybı	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Ciltte hipo-hiper pigmente leke	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Kas iskelet sistemi bulgusu	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
Diğer klinik bulgu	Kr. sinostoz	Aks. meme	-	-	-	-	Hashimoto	İng. herni	-	-
Daha önce normal olarak saptanan diğer tetkikler	22q11.2 FISH; Subtel. FISH; KRAS, BRAF, MAP2K1	-	15q11.2 FISH	FragilX DNA anal	-	-	-	15q11.2 FISH	Subtel. FISH Array CGH	15q11.2 FISH; FragilX DNA anal.; Subtel. FISH; 17p11.2 FISH
Karyotip	46,XY	46,XX	46,XX	46,XX	46,XX	46,XX	46,XX	46,XX	46,XX	46,XX
Mutasyon	Ekzon 7 c.855_856 p.E286Vfs7	Ekzon 3 c.277_281 p.V93Tfs23	Ekzon 8 c.1467 T>A p.Y489X	Ekzon 8 c.2761 C>T p.Arg921X	Ekzon 8 c.2083 C>T p.Arg695X	-	-	-	-	-

E: erkek; K: kız; AK: aort koarktasyonu; PDA: patent duktus arteriyozus; ASD: atriyal septal defekt; VSD: ventriküler septal defekt; PFO: patent foramen ovale; TY: triküspit yetmezlik; PS: pulmoner stenoz; PY: pulmoner yetmezlik

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada MWS ile uyumlu klinik-dismorfik bulguları olan hastaların detaylı klinik değerlendirmeleri, moleküler ve sitogenetik analizleri yapılmıştır.

Yapılan indirek hesaplamalar ile MWS'nin sıklığı 1/50.000-1/70.000 gibi tahmin edilmektedir. Bugüne kadar literatürde 200'den fazla MWS hastası ve 100'den fazla *ZEB2* mutasyonu bildirilmiştir (3). Bu durum hastalığın yeterince tanınmıyor, hastaların gerektiği kadar tanı alamıyor olmasına bağlı olabilir. Bu çalışmada geçtiğimiz 10 yılda klinik tanı alan 10 yeni hasta MWS ön tanısı ile değerlendirilmiş, 5 yeni hastanın tanısı dizi analizi ile ispatlanmış ve daha önce literatürde bildirilmemiş 2 yeni mutasyon tespit edilmiştir.

MWS'nin klinik-demografik özelliklerini derleyen erken çalışmalarda hastalarda bir erkek cinsiyet hakimiyeti olduğundan bahsedilmektedir, Garavelli ve ark. 2007'de yaptığı derlemede erkek:kız hasta oranı 1,42:1 olarak, yine Garavelli ve ark. 2009'da yaptığı çalışmada önceki literatür derlenerek erkek: kız oranı 106:85 olarak bildirilmiştir (4). Daha yeni yayınlarda erkek hasta grubunun dominansından bahsedilmemektedir. Bizim çalışmamızda 10 hastada erkek: kız oranı (1:9), mutasyon saptanan hastalarda erkek: kız oranı (1:4) şeklindeydi. Erkek hasta hakimiyeti yoktu, tam tersine kız hastalar çoğunlukta idi.

MWS otozomal dominant kalıtılan, *de novo*, *ZEB2* gen mutasyonları sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır, akrabalıkla ilişkisi bildirilen bir durum değildir. Bizim çalışma gurubumuzda da anne-baba arası akrabalık görülme oranı %20, mutasyon saptanan hastalarda da anne-baba arası akrabalık görülme oranı %20 şeklinde saptandı. Bu değerler Türkiye İstatistik Enstitüsü

Kurumu'nun 2012'de Türkiye genelinde %23,3 olarak bildirdiği akraba evliliği sıklığından daha yüksek değildir (<http://www.tuik.gov.tr>).

MWS hastalarının tamamında zeka geriliği görülür. Bu gerilik en az orta derecede, genellikle ağır zeka geriliği olarak tarif edilmiştir (3,4). Evans ve ark. 2012'de 61 MWS hastası üzerinde yaptığı çalışmada, hastalarda %10 orta derecede, %90 ağır derecede zeka geriliği saptamıştır (7). Garavelli ve ark. 2009'daki çalışmasında 8/13 hastada ağır (%61), diğerlerinde orta derecede zeka geriliği saptamıştır (9). Bu çalışmada %40 hastada ağır (IQ:0-25), %40 hastada orta derecede zeka geriliği (IQ: 25-50) saptanmıştır. Mutasyon gösterilen hastalarda ağır zeka geriliği görülme oranı %60 idi. Ağır zeka geriliği oranı genel olarak literatürden az görülmekle beraber dizi analizi ile tanısı ispatlanmış vakalardaki ağır zeka geriliği oranı literatürle uyumludur.

MWS'de motor gelişim basamaklarında gerilik tarif edilmiştir. Literatürde hastaların ortalama 20 ayda desteksiz oturduğu, 48 ayda yürüdüğü tarif edilmiştir (3,4). Çalışma grubumuzda mutasyon saptanan hastaların tamamında, 10 hastanın %90'ında motor gelişim basamakları geriydi. Hastalar median 9 (6-30) ayda desteksiz oturmuş, 38 (20 ay- 132 ay) ayda yürümüştü. Bu çalışma grubunda saptanan motor gerilik, özellikle gecikmiş yürüme yaşı, literatürle uyumludur.

MWS hastalarının 2-3 yaşında tek kelimelerle konuşmaya başlasa da, özellikle ifade edici dil fonksiyonları bozulmuştur, kelime kapasitesi 100-200 kelime ile sınırlıdır, pek çok hasta hiç konuşmamaktadır (3). Bizim çalışma grubumuzdaki hastaların tamamında konuşma gecikmesi saptandı, hastalarımız median 3 (2-9) yaşta konuşmuşlardı, %20 hasta hiç konuşmıyordu, kalanların konuşma kapasitesi 10-100 kelime ile sınırlı tek kelimeler şeklindeydi. Saptadığımız konuşma bozukluğu verileri literatürle uyumludur.

Literatürde MWS hastalarında %80 oranında mikrosefali bildirilmiştir (3,9). Bu çalışma da da mikrosefali hastaların tamamında %80, mutasyon (+) hastalarda %100 oranında saptanmıştır. Bu veri literatürle uyumludur.

MWS hastalarını çoğunda kısa boy ve ince, vücut yapısı tarif edilmektedir (3). Garavelli ve ark. 2007 ve 2009 yıllarında yaptıkları literatür derlemesinde kısa boy oranlarını %46 ve %50 olarak vermiştir (4,9). Literatürde henüz boy kısalığının sebebini açıklayan bir çalışma, bir büyüme hormonu çalışması mevcut değildir. Bizim çalışma grubumuzda literatürden farklı olarak hiçbir hastada boy kısalığı veya büyüme geriliği saptanmadı.

Çalışmamızda mutasyon saptanan hastaların tamamında (%100), bütün hastaların %80'inde tipik yüz bulguları mevcuttu. Literatürde MWS hastalarında yaşla belirginleşen tipik yüz bulguları mutasyon saptanan vakaların %98-100'ünde tanımlanmıştır (9). Fasiyal dismorfik bulgularla ilgili verilerimiz mevcut yayınlar ile uyumludur.

Mevcut yayınlarda %64-78 MWS hastasında nöbet tanımlanmıştır (3). Cordelli ve ark. 2013'te yayınlanan çalışmada bu sıklığı %70-75 olarak derlemişlerdir (16). Yine aynı çalışmada epilepsisi olan 22 MWS hastasında nöbetler, median 14,5 ayda (1-108) başlayan, uyku ile aktive olan, hipomotor veya fokal klonik nöbetler olarak tarif edilmiş, atipik absans nöbetlerin genellikle 4 yaşından sonra ortaya çıktığı belirtilmiş ve MWS'de görülen nöbetlerin tedaviye dirençli olduğu vurgulanmıştır (16). Bir başka yayında epilepsinin mekanizması kortikal ve striatal internöronların embriyonik gelişimindeki bozukluk olarak tanımlanmıştır (50). Bizim çalışmamızda hastaların %60'ında epileptik nöbet mevcuttu ve bu nöbetlerin üçte biri çoklu ilaç tedavisi gerektiren dirençli nöbetlerdi. Nöbetler median 2,5 yaşta (1-10) başlamıştı. Epilepsi ile ilgili verilerimiz literatür ile benzerlik göstermektedir.

Korpus kallozumun total veya parsiyel agenezisi literatürdeki hastalarda %40 rapor edilmiştir (3,6,13,39). Garavelli ve ark. 2009 bu oranı %46 olarak derlemişler, kendi hasta gruplarında %85 olarak tarif etmişlerdir(9). Bu çalışmada önceki çalışmalara uyumlu bir şekilde korpus kallozum aplazisi veya hipoplazisini %50 hastada saptandı. Bu oran mutasyon saptanan hastalarda %40 şeklindeydi.

Literatürde daha önce pilor stenozu olan 8 vaka bildirilmiştir (3,4,10,13,51), tam bir yüzde bildirilmemekle beraber disotonomik bulguları, uykusuzluk ve sabah çok erken saatte uyanma gibi şikayetleri olan hastalar da mevcuttur (3,4). Bu çalışmada hiçbir hastada pilor stenozu, disotonomik bulgu veya uyku bozukluğu saptanmadı. Uyku bozuklukları aslında ayırıcı tanıda Angelman sendromunda daha sık görülen bir durumdur (52). Evans ve ark. 2012'de yaptığı çalışmada MWS hastalarında %95 hastada oral davranışlar, %58 hastada stereotipik hareketler tanımlamıştır. MWS tanısı olmayan diğer özgül olmayan idiyopatik non-sendromik zeka geriliği mevcut hasta grubunda ise stereotipik davranış oranı %35 olarak verilmiştir (7). Bu çalışmada hasta grubumuzda oral davranışları %70, stereotipik hareketleri %10 oranında gözlenmiştir, mutasyon saptanan hastalarda ise oral davranış oranı %80'dir ve hiç birinde stereotipi mevcut değildir.

Eşlik eden cerrahi problem olmadıkça MWS'de neonatal veya bebeklik dönemi beslenme problemi bildirilmemiştir. Bizim hasta grubumuzda da hiçbir hastada beslenme öyküsünde problem kaydedilmedi.

Literatürde MWS'de %3 oranında yarı dudak damak kaydedilmiştir (9). Heinritz ve ark. 2006'da missense mutasyon ile beraber bilateral yarı dudak damağı bulunan atipik bir vaka takdim etmiştir (26). Bizim çalışmamızda hiçbir hastada yarı dudak damak anomalisi mevcut değildi.

MWS'de %4 yapısal göz anomalileri (Axenfeld anomalisi, katarakt, mikroftalmi, iris kolobomu) ve strabismus bildirilmiştir. Ayrıca hipermetropi ve iriste heterokromi sık rastlanan bulgulardır (3). Gregor-Evans ve ark. 2004'te trizomi 21 ve HSCP ile birlikte bilateral iris kolobomu ve miyopisi olan bir vaka takdim etmişlerdir (27). Sol optik sinirde aplazi ve santral koryoretinal kolobom ile birlikte bilateral iris kolobomu bulunan bir MWS vakası da mevcuttur (39). 2007'de Ariss ve ark. optik sinirde incelme ve retinada hipopigmentasyon olan bir başka vaka sunmuştur (28). Bizim çalışmamızda kırma kusuru %20, strabismus %10, iris kolobomu %10 hastada saptanan oküler bulgulardı. Ayrıca dizi analizi ile mutasyon saptayamadığımız tipik yüz

bulguları olan hastalardan birinde (hasta 7) sağ optik sinirde incelme ve retinada hipopigmentasyon mevcuttu. Çalışma grubumuzdaki hastaların oküler bulguları literatür ile benzerlik göstermektedir.

PDA, ASD, VSD, Fallot tetralojisi, pulmoner atrezi, pulmoner stenoz, aort koarktasyonu, aort stenozu, trakeal stenoz ile birlikte olan veya olmayan pulmoner arterial *sling* daha önce MWS hastalarında bildirilen konjenital kalp anomalileridir (3). Literatürde MWS hastalarında %50-54 sıklıkta konjenital kalp anomalisi bildirilmiştir (3,4,9). Bizim çalışmamızda konjenital kalp hastalığı %70 hastada saptandı, bu oran mutasyon saptanan hastalarda %80 şeklindeydi. Anomali tipleri literatürle benzer şekildeydi ancak sıklığı daha önce bildirilen değerlerden yüksekti.

Garavelli ve ark. 2009'da rapor ettikleri serideki tek vaka haricinde MWS'de sensörinöral işitme kaybı bildirilmemiştir, ancak tekrarlayan enfeksiyonlara bağlı iletim tipi kayıp olabilir (4,9). Bizim çalışmamızda mutasyon saptanmayan bir hastada tespit edilen tek taraflı sensörinöral işitme kaybı dışında tüm hastaların odyolojik muayene ve testleri doğaldı.

Literatürde MWS hastalarında %52 ürogenital-renal anomali tanımlanmıştır. Tek başına renal anomali görülme sıklığı %13, erkek hastalarda ise inmemiş testis %37, hipospadias %56 sıklıkla bildirilmiştir (9). Bizim çalışmamızda hiçbir hastada renal anomali mevcut değildi, sadece bir tek erkek hastamız vardı ve onda da hipospadias mevcuttu.

ZEB2 gen fonksiyonu santral sinir sistemi ve enterik sinir sistemi gelişimi ve miyelinizasyonu için gereklidir (33,53) . Ayrıca HCSP tek başına yüksek oranda serebral disgenezi ve malformasyonla ilişkili bir durum olarak araştırılmayı hak eden bir durumdur (54). Literatürde MWS hastalarında HCSP görülme sıklığı %54-60 olarak bildirilmiştir (9,17). Ayrıca MWS hastalarında görülen HCSP kliniğinin daha ağır bildirilmiştir (17). MWS ile birlikte olan HCSP'nin yenidoğan-bebeklik döneminde klinik bulgu vermesi şart değildir. Yoneda ve ark. 2002'de 48 yaşında megakolon geliştiren bir vaka yayınlamıştır (18). Biz bu çalışmada HCSP görülme oranını %20 olarak tespit

ettik. Mutasyon saptanan ve saptanmayan hastalarımızda bu oran eşitti. HSCP gibi gürültülü bir klinikle başvuran, uzun süre hastanede yatış öyküsü bulunan hastaların araştırılıp erken tanı alması ihtimali, HSCP kliniği olmayan MWS hastalarından daha yüksektir. HSCP ile bulgu vermeyen vakalara tanı koymak iyi bir klinik ve dismorfik deneyim gerektirir. Literatürde de klinisyenlerin MWS ile ilgili dismorfik deneyimleri, farkındalıkları arttıkça serilerdeki HSCP görülme yüzdesinin azaldığından bahsedilmektedir. Biz kendi çalışma grubumuzdaki HSCP görülme yüzdesinin literatürde bildirilenlerden daha düşük olmasını, HSCP kliniği olmayan hastaların dismorfik bulguları ile tanınma başarısının yüksekliğine bağladık.

Bu çalışmada mutasyon saptanan vakaların tamamında, tüm vakaların %70'inde hayatlarının herhangi bir döneminde olan veya aralıklı tekrar eden dirençli kabızlık şikayeti tespit edilmiştir. Literatürde bu oran %30 olarak bildirilmiştir (9). MWS'de kabızlık şikayetinden intestinal hipoganglionozisin sorumlu olduğu söyleyen yayınlar mevcuttur (14,55).

Literatürde nadir tek vakalar şeklinde MWS ile disfaji, biliyer atrezi ve kolestaz gibi bulgular bildirilmiştir (56,57). Çalışma grubumuzdaki hiçbir hastada bu bulgulara rastlanmamıştır. Bu çalışmada %20 hastada ciltte hiper-hipopigmente leke, %20 hastada pes planus, ve %50 hastada dişlerde maloklüzyon kaydedilmiştir. Tüm bunlar literatürde daha önce bildirilmiş bulgulardır (3,4,29).

Çalışma grubumuzdaki hastalarda kaydettiğimiz diğer klinik bulgular ise birer hastada saptanan, aksesuar meme başı, Hashimoto tiroiditi ve inguinal herni şeklindeydi. MWS'de aksesuar meme görülebildiği bilinen bir durumdur (12). Adam ve ark 2008'de koronal kraniyosinostozu olan bir MWS vakası bildirmişlerdir (24). Bizim mutasyon saptanan vakalarımızdan birinde sagittal sütürde kraniyosinostoz ve skafosefali mevcuttu. Bu durumda hastamız MWS ile kraniyosinostoz görülen ikinci vakadır. Daha önce Hashimoto tiroiditi bildirilen bir vaka yoktur, ancak bunun ko-insidental bir durum olabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmada hastaların hiçbirinde sitogenetik değişiklik saptanmamıştır. Literatürde sitogenetik analizle hastalığa sebep olabilecek değişiklik saptanma oranı %2, diğer tekniklerle (*MLPA*, qPCR, *array-CGH*) saptanabilen tam veya kısmi ekzon delesyonlarının toplam oranı %20 olarak verilmiştir, delesyon büyüklüğü ile klinik bulguların şiddeti arasında korelasyon kurulamamıştır (8,29,37).

Bu çalışmada dizi analiziyle hastalığa sebep olduğu düşünülen mutasyon, tüm vakalarda %50, tipik yüz bulguları olan hastalarda %62 oranında saptanmıştır. Ayrıca saptanan 5 mutasyonun 3'ü *nonsense* (%60), 2'si *frameshift* (%40) mutasyondur ve mutasyonların 3'ü ekzon 8'de bulunmaktadır (%60). Literatürde dizi analizi ile hastalığa sebep genetik değişikliği saptama oranı %70-80 olarak verilmiştir (3-5,29,37), mutasyonların %67'sinin ekzon 8'e lokalize olduğundan bahsedilmiş ve mutasyonların %41 oranında *frameshift* ve %31 oranında *nonsense* mutasyon olduğu belirtilmiştir. *Missense* mutasyonlar literatürde nadirdir. Bu bilgiler ışığında saptadığımız mutasyonların lokalizasyonu ve tipi literatürle uyumludur. Tipik yüz bulguları olan hastalarda mutasyon saptayabilme oranımız literatürden çok farklı değildir.

Bu çalışmada tipik bulguları olup mutasyon saptanmayan hastalara, etyolojiye sebep olabilecek submikroskopik delesyonların saptanması açısından *MLPA*, real time qPCR, *array-CGH* gibi tetkikler yapılabilirse hastalığa sebep yeni değişiklikler saptanabilir. Mutasyon saptayamadığımız hastalar için bir başka açıklama periferik kandan izole ettiğimiz DNA örneğinde değişiklik saptamamıza engel somatik mozaisizm ihtimali olabilir veya hastalıktan sorumlu olabilecek henüz tanımlanmamış *ZEB2* dışındaki genler sözkonusu olabilir. Nitekim, önceki yayınlarda da tüm genetik tetkikler kullanılsa bile %10 kadar bir hasta grubunda hastalığa sebep genetik değişikliğin saptanamadığı ifade edilmiştir (37).

ZEB2 geninde ekzon 3'te saptanan c.227_281 frameshift delesyon mutasyonu ve ekzon 8'de saptanan nonsense c.1467 T>A mutasyonu daha

önce yayınlanmamış yeni mutasyonlardır. Bugüne kadar literatürde 110'dan fazla *ZEB2* gen değişikliği saptanmıştır (3,29). Pek çoğu ekzon 8'de lokalize olan bu mutasyonların bazılarının literatürde pek çok hastada bildirilen tekrar eden mutasyonlar olduğu görülmüştür. Sık tekrar eden bu mutasyonlar 2083C>T, 2761C>T, 1027C>T ve 904C>T'dir (4,8) . En sık tekrar eden mutasyon olan 2083C>T, bizim çalışmamızda hasta 5'te, ikinci sık tekrar eden mutasyon olan 2761C>T ise hasta 4'te saptanmıştır. *ZEB2* geni, küçük değişikliklerin hemen fonksiyon bozukluğuna sebep olduğu evrimsel olarak iyi korunmuş, fazla polimorfik değişiklik tarif edilmeyen bir genidir (3,8,37). Dastot ve ark. 2007 yılında yaptıkları çalışmada önceki yayınları da derleyerek toplam 3 polimorfik değişiklik tanımlamışlardır (8). Biz bu çalışmada literatürde daha önce tanımlanmamış herhangi bir polimorfik değişiklik saptamadık.

MWS'de literatürde henüz tanımlanmış bir genotip-fenotip ilişkisi yoktur. Delesyon tipi veya mutasyon tipi *ZEB2* gen disfonksiyonu olanlar arasında hastalığın klinik şiddeti, gidişi veya bulguları arasında bir farklılık tanımlanmamıştır. Herhangi bir mutasyon tipine özgü bir bulgu veya klinik seyir hali de bilinmemektedir. Sadece büyük delesyonlarda *ZEB2* dışında genler de etkilenmişse, yani ardışık gen delesyon sendromu söz konusu olduğunda, klinik seyir ve şiddet farklı olabilir. Ayrıca literatürde nadir görülen *missense* mutasyonlar ile atipik değişken klinik bulgular olabildiğini gösteren yayınlar mevcuttur (26,40,58) . Biz bu çalışmada kendi hasta grubumuzdaki klinik bulguları belirledik, ve 2'si yeni 5 farklı moleküler değişiklik tespit ettik. Bu çalışmadaki hasta sayısı genotip-fenotip ilişkisi kurmak için yeterli değildir, ancak verilerimiz literatüre katkı sağlayacaktır.

Bu çalışmaya katılan tüm hasta ailelerine genetik danışma verilmiş, mutasyon saptanan ailelere genetik danışma ile beraber prenatal tanı imkanı sunulmuştur. Her ne kadar hastalığın otozomal dominant *de novo* kalıtım karakteri sebebiyle tekrar etmesi beklenmese de germ hücre dizisi mutasyon ihtimali dışlanamadığı ve kardeş tekrarı bildiren vakalar olduğu için ailelere prenatal tanı imkanı verilmelidir (20,39,59).

6. SONUÇLAR

1. MWS ile uyumlu klinik bulguları olduğu için çalışmaya dahil edilen 10 hastada dizi analizi ile mutasyon gösterebilme oranımız %50 idi.
2. Saptanan 5 mutasyonun 3'ü (%60) *nonsense*, 2'si (%40) *frameshift* mutasyondur.
3. ZEB2 geninde ekzon 3'te saptanan c.227_281 frameshift delesyon mutasyonu ve ekzon 8'de saptanan nonsense c.1467T>A mutasyonu daha önce tanımlanmamış yeni mutasyonlardır ve yayınlanması literatüre katkı sağlayacaktır.
4. MWS ile uyumlu klinik bulguları olduğu için çalışmaya dahil edilen 10 hastada erkek: kız oranı (1:9), mutasyon saptanan hastalarda erkek: kız oranı (1:4), anne-baba arası akrabalık görülme oranı %20 şeklindeydi.
5. Hastaların tamamında zeka geriliği, motor gelişme geriliği, konuşma gecikmesi ve mutasyon saptanan hastaların tamamında mikrosefali, dirençli kabızlık, tipik yüz bulguları mevcuttu.
6. Hastaların (6/10) %60'ında epileptik nöbet, (5/10) %50'sinde korpus kallozum aplazisi veya hipoplazisi, (7/10) %70'inde oral davranışlar, (1/10) %10'unda stereotipik hareketler, (2/10) %20'sinde HSCP, (7/10) %70'inde konjenital kalp hastalığı, (2/10) %20'sinde kırma kusuru, (1/10) %10'unda strabismus ve iris kolobomu saptandı.
7. Yüzde yirmi hastada (2/10), ciltte hiperhipopigmente leke, (2/10) %20 pes planus, (1/10) %10 hipospadiyas ve (5/10) %50 hastada dişlerde maloklüzyon kaydedildi.

8. Hiçbir hastada sitogenetik değişiklik saptanmadı. Renal anomali, boy kısalığı veya büyüme geriliği, uyku bozukluğu, sensörinöral işitme kaybı, disotonomik bulgu, pilor stenozu, yarık dudak-damak anomalisi hiçbir hastada mevcut değildi.
9. Diğer muayene bulguları birer hastada saptanan, kraniyosinostoz, aksesuar meme başı, Hashimoto tiroiditi ve inguinal herni şeklindeydi.
10. Hastalığa sebep olduğu düşünölen mutasyon tüm vakalarda %50, tipik yüz bulguları olan hastalarda (5/8) %62 oranında dizi analizi ile saptandı.
11. Tipik bulguları olup mutasyon saptanmayan hastalar, etyolojiye sebep olabilecek submikroskopik delesyonların saptanması açısından *MLPA* veya *real time qPCR* gibi tetkiklerin yapılması veya hastalıktan sorumlu olabilecek *ZEB2* dışındaki genlerin araştırılması çalışmalarına alınmaya aday olarak belirlenmiştir.
12. Hasta grubunda sık görölen klinik bulgular tanımlanarak tanısal değeri yüksek klinik bulguları belirlenmiş, böylece ileride başvurabilecek hastaların daha hızlı tanınması sağlanmaya çalışılmıştır. Tüm ailelere genetik danışma verilmiş, mutasyon saptanan ailelere genetik danışma ile beraber prenatal tanı imkanı sunulmuştur. Elde edilen bilgiler ışığında tüm hastalar ve ailelerine daha iyi bir izlem, tedavi ve rehabilitasyon imkanı sunulmaya çalışılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Mowat, D.R., Croaker, G.D., Cass, D.T., Kerr, B.A., Chaitow, J., Ades, L.C. et al. (1998) Hirschsprung disease, microcephaly, mental retardation, and characteristic facial features: delineation of a new syndrome and identification of a locus at chromosome 2q22-q23. *J Med Genet*, 35 (8), 617-623.
2. Wakamatsu N, Y.Y., Yamada K, Ono T, Nomura N, Taniguchi H, Kitoh H, Mutoh N, et al. (2001) Mutations in SIP1, encoding Smad interacting protein-1, cause a form of Hirschsprung disease. *Nat Genet*, 27, 369-370.
3. Mowat DR, W.M. (2010). Mowat-Wilson syndrome (In:Cassidy SB, Allanson JE, editors. Management of genetic syndromes. 2e. New York: John Willey and Sons. p:517-529. bs.).
4. Garavelli, L., Mainardi, P.C. (2007) Mowat-Wilson syndrome. *Orphanet J Rare Dis*, 2, 42.
5. Saunders, C.J., Zhao, W., Ardinger, H.H. (2009) Comprehensive ZEB2 gene analysis for Mowat-Wilson syndrome in a North American cohort: a suggested approach to molecular diagnostics. *Am J Med Genet A*, 149A (11), 2527-2531.
6. Zweier, C., Thiel, C.T., Dufke, A., Crow, Y.J., Meinecke, P., Suri, M. et al. (2005) Clinical and mutational spectrum of Mowat-Wilson syndrome. *Eur J Med Genet*, 48 (2), 97-111.
7. Evans, E., Einfeld, S., Mowat, D., Taffe, J., Tonge, B., Wilson, M. (2012) The behavioral phenotype of Mowat-Wilson syndrome. *Am J Med Genet A*, 158A (2), 358-366.

8. Dastot-Le Moal, F., Wilson, M., Mowat, D., Collot, N., Niel, F., Goossens, M. (2007) ZFH1B mutations in patients with Mowat-Wilson syndrome. *Hum Mutat*, 28 (4), 313-321.
9. Garavelli, L., Zollino, M., Mainardi, P.C., Gurrieri, F., Rivieri, F., Soli, F. et al. (2009) Mowat-Wilson syndrome: facial phenotype changing with age: study of 19 Italian patients and review of the literature. *Am J Med Genet A*, 149A (3), 417-426.
10. Cerruti Mainardi, P., Pastore, G., Zweier, C., Rauch, A. (2004) Mowat-Wilson syndrome and mutation in the zinc finger homeo box 1B gene: a well defined clinical entity. *J Med Genet*, 41 (2), e16.
11. Mowat, D.R., Wilson, M.J., Goossens, M. (2003) Mowat-Wilson syndrome. *J Med Genet*, 40 (5), 305-310.
12. Adam MP, S.S., Gallagher R, Brady AN, Barr K, Blumberg B, Shieh JT, et al. (2006) Clinical features and management issues in Mowat-Wilson syndrome. *Am J Med Genet* 140A, 2730-2741.
13. Wilson, M., Mowat, D., Dastot-Le Moal, F., Cacheux, V., Kaariainen, H., Cass, D. et al. (2003) Further delineation of the phenotype associated with heterozygous mutations in ZFH1B. *Am J Med Genet A*, 119A (3), 257-265.
14. Ishihara, N., Shimada, A., Kato, J., Niimi, N., Tanaka, S., Miura, K. et al. (2005) Variations in aganglionic segment length of the enteric neural plexus in Mowat-Wilson syndrome. *J Pediatr Surg*, 40 (9), 1411-1419.
15. Zweier, C., Temple, I.K., Beemer, F., Zackai, E., Lerman-Sagie, T., Weschke, B. et al. (2003) Characterisation of deletions of the ZFH1B region and genotype-phenotype analysis in Mowat-Wilson syndrome. *J Med Genet*, 40 (8), 601-605.

16. Cordelli DM, G.L., Savasta S, Guerra A, Pellicciari A, Giordano L, BonettiS, et al. (2013) Epilepsy in Mowat-Wilson syndrome: Delineation of the electroclinical phenotype. *Am J Med Genet A*, 161 (2), 273-284.
17. Bonnard, A., Zeidan, S., Degas, V., Viala, J., Baumann, C., Berrebi, D. et al. (2009) Outcomes of Hirschsprung's disease associated with Mowat-Wilson syndrome. *J Pediatr Surg*, 44 (3), 587-591.
18. Yoneda M, F.T., Yamada Y, Yamada K, Fujii A, Inagaki T, Nakagawa H, et al. (2002) Late infantile Hirschsprung disease-mental retardation syndrome with a 3-bp deletion in ZFHX1B. *Neurology*, 59, 1637-1640.
19. Hoffer, M.J., Hilhorst-Hofstee, Y., Knijnenburg, J., Hansson, K.B., Engelberts, A.C., Laan, L.A. et al. (2007) A 6Mb deletion in band 2q22 due to a complex chromosome rearrangement associated with severe psychomotor retardation, microcephaly and distinctive dysmorphic facial features. *Eur J Med Genet*, 50 (2), 149-154.
20. Ohtsuka, M., Oguni, H., Ito, Y., Nakayama, T., Matsuo, M., Osawa, M. et al. (2008) Mowat-Wilson syndrome affecting 3 siblings. *J Child Neurol*, 23 (3), 274-278.
21. Sasso, A., Paucic-Kirincic, E., Kamber-Makek, S., Sindicic, N., Brajnovic-Zaputovic, S., Brajenovic-Milic, B. (2008) Mowat--Wilson syndrome: the clinical report with the novel mutation in ZFHX1B (exon 8: c.2372del C; p.T791fsX816). *Childs Nerv Syst*, 24 (5), 615-618.
22. Ishihara, N., Yamada, K., Yamada, Y., Miura, K., Kato, J., Kuwabara, N. et al. (2004) Clinical and molecular analysis of Mowat-Wilson syndrome associated with ZFHX1B mutations and deletions at 2q22-q24.1. *J Med Genet*, 41 (5), 387-393.
23. Zweier, C., Albrecht, B., Mitulla, B., Behrens, R., Beese, M., Gillessen-Kaesbach, G. et al. (2002) "Mowat-Wilson" syndrome with and without Hirschsprung disease is a distinct, recognizable multiple congenital

anomalies-mental retardation syndrome caused by mutations in the zinc finger homeo box 1B gene. *Am J Med Genet*, 108 (3), 177-181.

24. Adam MP, J.A., Bean LJ, Fernhoff PM. (2008) Mowat- Wilson syndrome with craniosynostosis: a case report. *Am J Med Genet A*, 146A (15), 245-246.
25. Garavelli, L., Cerruti-Mainardi, P., Viridis, R., Pedori, S., Pastore, G., Godi, M. et al. (2005) Genitourinary anomalies in Mowat-Wilson syndrome with deletion/mutation in the zinc finger homeo box 1B gene (ZFHX1B). Report of three Italian cases with hypospadias and review. *Horm Res*, 63 (4), 187-192.
26. Heinritz, W., Zweier, C., Froster, U.G., Strenge, S., Kujat, A., Syrbe, S. et al. (2006) A missense mutation in the ZFHX1B gene associated with an atypical Mowat-Wilson syndrome phenotype. *Am J Med Genet A*, 140 (11), 1223-1227.
27. Gregory-Evans CY, V.H., Dalton R, Adams GG, Salt A, Gregory-Evans K. (2004) Ocular coloboma and high myopia with Hirschsprung disease associated with a novel ZFHX1B missense mutation and trisomy 21. *Am J Med Genet A*, 131 (15), 86-90.
28. Ariss, M., Natan, K., Friedman, N., Traboulsi, E.I. (2012) Ophthalmologic Abnormalities in Mowat-Wilson Syndrome and a Mutation in ZEB2. *Ophthalmic Genet*, 33 (3), 159-160.
29. Adam, M.P., Bean, L.J.H., Miller, V.R. (1993). Mowat-Wilson Syndrome. R. A. Pagon, T. D. Bird, C. R. Dolan, K. Stephens & M. P. Adam (Ed.). GeneReviews. Seattle (WA)
30. Cacheux, V., Dastot-Le Moal, F., Kaariainen, H., Bondurand, N., Rintala, R., Boissier, B. et al. (2001) Loss-of-function mutations in SIP1 Smad interacting protein 1 result in a syndromic Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet*, 10 (14), 1503-1510.

31. Garavelli, L., Donadio, A., Zanacca, C., Banchini, G., Della Giustina, E., Bertani, G. et al. (2003) Hirschsprung disease, mental retardation, characteristic facial features, and mutation in the gene ZFHX1B (SIP1): confirmation of the Mowat-Wilson syndrome. *Am J Med Genet A*, 116A (4), 385-388.
32. Verstappen G, v.G.L., Michiels C, Van de Putte T, Souopgui J, Van Damme J, Bellefroid E, et al. (2008) Atypical Mowat-Wilson patient confirms the importance of the novel association between ZFHX1B/SIP1 and NuRD corepressor complex. *Hum Mol Genet*, 17(8), 1175-1183.
33. Weng, Q., Chen, Y., Wang, H., Xu, X., Yang, B., He, Q. ve diğeri. (2012) Dual-mode modulation of Smad signaling by Smad-interacting protein Sip1 is required for myelination in the central nervous system. *Neuron*, 73 (4), 713-728.
34. El-Kasti MM, W.T., Carter DA. (2012) A novel long-range enhancer regulates postnatal expression of Zeb2: implications for Mowat-Wilson syndrome phenotypes. *Hum Mol Genet.*, 21 (26), 5429-5442.
35. Espinosa-Parrilla Y, A.J., Augé J, Encha-Razavi F, Munnich A, Lyonnet S, Vekemans M, Attié-Bitach T. (2002) Expression of the SMADIP1 gene during early human development. *Mech Dev.*, 114 (1-2), 187-191.
36. Vandewalle C, V.R.F., Berx G. (2009) The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease. *Cell Mol Life Sci.*, 66 (5), 773-787.
37. Zollino, M., Garavelli, L., Rauch, A. (2011) Clinical utility gene card for: Mowat-Wilson syndrome. *Eur J Hum Genet*, 19 (8).
38. Silengo M, F.G., Wakamatsu N. (2004) Pachygyria and cerebellar hypoplasia in a patient with a 2q22-q23 deletion that includes the ZFHX1B gene. *Am J Med Genet A*, 15 (127A), 109.

39. McGaughran, J., Sinnott, S., Dastot-Le Moal, F., Wilson, M., Mowat, D., Sutton, B. et al. (2005) Recurrence of Mowat-Wilson syndrome in siblings with the same proven mutation. *Am J Med Genet A*, 137A (3), 302-304.
40. Zweier, C., Horn, D., Kraus, C., Rauch, A. (2006) Atypical ZFX1B mutation associated with a mild Mowat-Wilson syndrome phenotype. *Am J Med Genet A*, 140 (8), 869-872.
41. Ballarati, L., Recalcati, M.P., Bedeschi, M.F., Lalatta, F., Valtorta, C., Bellini, M. et al. (2009) Cytogenetic, FISH and array-CGH characterization of a complex chromosomal rearrangement carried by a mentally and language impaired patient. *Eur J Med Genet*, 52 (4), 218-223.
42. Choy KW, T.K., Chan AW, Lau TK, Leung TY. (2010) Second-trimester detection of Mowat-Wilson syndrome using comparative genomic hybridization microarray testing. *Obstet Gynecol*, 115, 462-465.
43. Brooks AS, B. A., Burzynski GM, Breedveld GJ, Osinga J, Boven LG, Hurst JA, et al. (2005) Homozygous nonsense mutations in KIAA1279 are associated with malformations of the central and enteric nervous systems. *Am J Hum Genet*, 77 (1), 120-126.
44. Brooks AS, B.M., Osinga J, vd Smagt JJ, Catsman CE, Buys CH, Meijers C, Hofstra RM. (1999) A consanguineous family with Hirschsprung disease, microcephaly, and mental retardation (Goldberg-Shprintzen syndrome). *J Med Genet*, 36 (6), 485-489.
45. Parisi, M. (Updated 2011) Hirschsprung Disease Overview. *GeneReviews, University of Washington, Seattle.*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1439>.
46. Ball EV, S.P., Abeysinghe SS, Krawczak M, Cooper DN, Chuzhanova NA. (2005) Microdeletions and microinsertions causing human genetic

disease: common mechanisms of mutagenesis and the role of local DNA sequence complexity. *Hum Mutat*, 26, 205-213.

47. Cooper DN, B.A., Férec C, Vasquez KM, Kehrer-Sawatzki H, Chen JM. (2011) On the sequence-directed nature of human gene mutation: the role of genomic architecture and the local DNA sequence environment in mediating gene mutations underlying human inherited disease. *Hum Mutat*, 32, 1075-1099.
48. Chen JM, F.Y., Jamet D, Dupont I, Cooper DN, Le Maréchal C, Férec C. (2013) Small deletions within the RHD coding sequence: a report of two novel mutational events and a survey of the underlying pathophysiologic mechanisms. *Transfusion*, 53, 206-210.
49. Yamada K, Y.Y., Nomura N, Miura K, Wakako R, Hayakawa C, Matsumoto A, et al. (2001) Nonsense and frameshift mutations in ZFH1B, encoding Smad-interacting protein 1, cause a complex developmental disorder with a great variety of clinical features. *Am J Hum Genet*, 69, 1178-1185.
50. McKinsey GL, L.S., Trzcinski B, Visel A, Pennacchio LA, Huylebroeck D, Higashi Y, Rubenstein JL. (2013) Dlx1&2-dependent expression of Zfhx1b (Sip1, Zeb2) regulates the fate switch between cortical and striatal interneurons. *Neuron*, 77, 83-98.
51. Amiel J, E.-P.Y., Steffann J, Gosset P, Pelet A, Prieur M, Boute O, et al. (2001) Large-scale deletions and SMADIP1 truncating mutations in syndromic Hirschsprung disease with involvement of midline structures. *Am J Hum Genet*, 69, 1370-1377.
52. Dagli A, B.K., Williams CA. (2012) Molecular and Clinical Aspects of Angelman Syndrome. *Mol Syndromol*, 2 (3-5), 100-112.

53. Stanchina, L., Van de Putte, T., Goossens, M., Huylebroeck, D., Bondurand, N. (2010) Genetic interaction between Sox10 and Zfhx1b during enteric nervous system development. *Dev Biol*, 341 (2), 416-428.
54. Carrascosa-Romero, M.C., Fernandez-Cordoba, M.S., Gonzalez-Pinera, J., Gutierrez-Junquera, C., Pardal-Fernandez, J.M. (2007) [Neurocristopathies: a high incidence of cerebral dysgenesis in patients with Hirschsprung's disease]. *Rev Neurol*, 45 (12), 707-712.
55. Cuturilo, G., Stefanovic, I., Jovanovic, I., Miletic-Grkovic, S., Novakovic, I. (2009) [Mowat-Wilson syndrome--a case report]. *Srp Arh Celok Lek*, 137 (7-8), 426-429.
56. Prijoles, E.J., Adam, M. (2010) Mowat-Wilson syndrome with associated dysphagia. *Am J Med Genet A*, 152A (2), 484-485.
57. Cui, S., Erlichman, J., Russo, P., Haber, B.A., Matthews, R.P. (2011) Intrahepatic biliary anomalies in a patient with Mowat-Wilson syndrome uncover a role for the zinc finger homeobox gene zfhx1b in vertebrate biliary development. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 52 (3), 339-344.
58. Ghoumid J, D.L., Alavi-Naini SM, Bondurand N, Rio M, Briand-Suleau A, Nasser M, Goodwin L, et al. (2013) ZEB2 zinc-finger missense mutations lead to hypomorphic alleles and a mild Mowat-Wilson syndrome. *Hum Mol Genet*, [Epub ahead of print].
59. Cecconi, M., Forzano, F., Garavelli, L., Pantaleoni, C., Grasso, M., Dagna Bricarelli, F. et al. (2008) Recurrence of Mowat-Wilson syndrome in siblings with a novel mutation in the ZEB2 gene. *Am J Med Genet A*, 146A (23), 3095-3099.

8. EKLER

EK-1. Klinik değerlendirme formu

MOWAT WILSON SENDROMLU HASTA KLİNİK DEĞERLENDİRME FORMU

İsim:	Doğum tarihi:	Cinsiyet: <input type="checkbox"/> E; <input type="checkbox"/> K
Dosya no:	İletişim: Tel: Adres:	

Başvuru şikayeti/şekli:

Tanı: MWS şüphesi (hangi yaşta).....
 Diğer şüphelenilen tanılar.....

Karyotip:.....

ZEB2 ANALİZ SONUCU:.....

Diğer genetik çalışmalar: Angelman , subtelomerik , Diğer:.....

Prenatal:.....

Akrabalık:	Köken:
Aile ağacı:	

DOĞUM ÖLÇÜLERİ: (.....hafta)
Ağırlık:.....(.....p)
Boy:.....(.....p)
Baş çevresi:.....(.....p)

MEVCUT ÖLÇÜMLER: Vucut ağırlığı:.....(.....p)
Boy:.....(.....p)
Baş çevresi:.....(.....p/SD)
Kulaç mesafesi:.....

BÜYÜME GERİLİĞİ: yok
 var:....., varsa başlangıç yaşı:.....

GELİŞİM: Baş kontrolü:.....
Oturma:.....
Yürüme yaşı:.....
Konuşma yaşı:.....
Tuvalet alışkanlığı:..... Özbakım:.....

- DİSMORFİK BULGULAR:** Hipertelorizm
 Geniş kaşlar
 Belirgin columella
 Tipik çene
 Uplifted kulak memesi

- Damak.....
 Göz rengi....., heterokromi.....
 Ciltte depigmentasyon.....
 Ekstremiteler.....
 Uzun parmaklar.....
 Torasik deformite.....
 Skolyoz.....

Diğer:.....

KARDİYAK MALFORMASYON: Yok

- Var, tipi:.....
 Araştırılmamış, EKO istendi:.....

NÖROLOJİK BOZUKLUK: Yok

- Zihinsel yetersizlik, derecesi:.....
 Ataksi, başlama yaşı:.....
 Hiperventilasyon, başlama yaşı:.....
 Nöbet: başlama yaşı:..... tipi:.....
 EEG:.....
 Psikometrik değerlendirme/IQ:.....

KRANİYAL GÖRÜNTÜLEME (MRI): Görüntüleme yaşı:..... Sonucu:.....

İNTESTİNAL: Yok

- Var, tipi:.....
 Açıklanamayan kabızlık: Şiddetli/sürekli..... Bazen.....
 HSCR: Tanı metodu:..... Aganglionik segment uzunluğu:.....
 Kronik intestinal psödo-obstrüksiyon: şiddetli kabızlıkla beraber normal histoloji

GENİTO-ÜRİNER: Yok

- Var, tipi:.....
 Araştırılmamış, Pelvik/renalUSG istendi:.....

İŞİTME TESTİ:

GÖZ MUAYENESİ:

DIŞ MUAYENESİ:

KAS-İSKELET SİSTEMİ BULGULARI: FM:.....
Xray/skolyoz grafisi:.....

DAVRANIŞ PROFİLİ: Değişik objeleri veya vücut parçalarını ısırma

- Yiyecek olmayan şeyleri yeme (sabun, ot vs...)
 Cisimlere vurma-döndürme
 Diş gıcırdatma
 Repetitif aktiviteler (ışık açma kapama, vs..)
 Ağrılı uyarana az tepki
 Uygunsuz mutlu hal
 Deprese mutsuz duygu durumu
- Sebepsiz çabuk ağlama
 Hızlı mood değişikliği
 Sebepsiz gülmeler
 Yalnız vakit geçirme eğilimi
 Artmış anksiyete
 Kendine zarar verme
 Etrafa zarar verme
 Antisosyal, iletişim sıkıntısı